

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK SEMUT
JEPANG (*Uromyces dermatoides*) TERHADAP JUMLAH
SEL KUPFFER DAN EKSPRESI TNF- α HEPAR PADA
TIKUS WISTAR (*Rattus norvegicus*) YANG
DIINDUKSI *STREPTOZOTOCIN***

SKRIPSI



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK SEMUT JEPANG
(*Uromoides dermestoides*) TERHADAP JUMLAH SEL
KUPFFER DAN EKSPRESI TNF- α HEPAR PADA
TIKUS WISTAR (*Rattus norvegicus*) YANG
DIINDUKSI *STREPTOZOTOCIN***

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:

WINARTI SETYO RINI

145130107111015



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**Pengaruh Pemberian Ekstrak Semut Jepang (*Ulomoides dermestoides*)
terhadap Jumlah Sel Kupffer dan Ekspresi TNF- α Hepar pada Tikus
Wistar (*Rattus novergicus*) yang Diinduksi *Streptozotocin***

Oleh:

WINARTI SETYO RINI

145130107111015

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 26 Juli 2018
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Dosen Pembimbing I

Dosen Pembimbing II

Prof. Ir. Hendrawan S., M. Rur. Sc. Ph. D

NIP. 19530602 198003 1 003

drh. Viski Fitri Hendrawan, M. Vet

NIP. 19880518 201504 1 003

Mengetahui,

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES

NIP. 19600903 198802 2 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Winarti Setyo Rini

NIM : 145130107111015

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi berjudul:

Pengaruh Pemberian Ekstrak Semut Jepang (*Ulomoides dermestoides*) terhadap Jumlah Sel Kupffer dan Ekspresi TNF- α Hepar pada Tikus Wistar (*Rattus novergicus*) yang Diinduksi *Streptozotocin*

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, makasaya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 6 Agustus 2018

Yang menyatakan,

(Winarti Setyo Rini)

NIM. 145130107111015

Pengaruh Pemberian Ekstrak Semut Jepang (*Ulomoides dermestoides*) terhadap Jumlah Sel Kupffer dan Ekspresi TNF- α Hepar pada Tikus Wistar (*Rattus novergicus*) yang Diinduksi *Streptozotocin*

ABSTRAK

Penyakit Diabetes melitus (DM) tipe 1 merupakan penyakit kelainan metabolik yang ditandai dengan terjadinya hiperglikemia akibat kerusakan sel β . Kerusakan sel β pankreas oleh induksi *streptozotocin* terjadi karena tingginya produksi ROS. Tingginya kadar glukosa dalam darah menyebabkan meningkatnya proses glikasi yang membentuk *advanced glycation end products* (AGEs) yang memicu inflamasi jaringan. Senyawa *limonene* dalam ekstrak etanol semut jepang berfungsi sebagai antioksidan dan antiinflamasi. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek pemberian ekstrak semut jepang (*Ulomoides dermestoides*) terhadap jumlah sel Kupffer hepar dan ekspresi TNF- α . Hewan coba yang digunakan adalah tikus strain Wistar dengan berat badan ± 200 gram sebanyak 25 ekor dalam 5 kelompok perlakuan. Kelompok 1 merupakan kelompok kontrol negatif, kelompok 2 merupakan kelompok kontrol positif yang diinduksi dengan *streptozotocin* dosis 20 mg/KgBB selama 5 hari, kelompok 3, 4 dan 5 adalah kelompok perlakuan yang diinduksi dengan *streptozotocin* dosis 20 mg/KgBB selama 5 hari yang diberikan ekstrak semut jepang dengan menggunakan dosis 2,3 mg/KgBB, 4,6 mg/KgBB dan 9,2 mg/KgBB selama 14 hari. Parameter yang diamati adalah jumlah sel Kupffer hepar dengan menggunakan pemeriksaan histopatologi dengan pewarnan *Hematoxyline eosin* dan ekspresi TNF- α dengan metode pewarnaan imunohistokimia. Hasil penelitian dianalisa dengan menggunakan uji ragam ANOVA dilanjutkan dengan uji *Tukey* atau *BNJ*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak semut jepang (*Ulomoides dermestoides*) secara signifikan ($p < 0,05$) menurunkan jumlah sel Kupffer dan ekspresi TNF- α pada tikus yang diinduksi *streptozotocin* dengan dosis paling baik yaitu 2,3 mg/KgBB, akan tetapi kadar glukosa darah masih menunjukkan hiperglikemia pada seluruh kelompok perlakuan.

Kata kunci : Diabetes melitus, *Rattus novergicus*, TNF- α , semut jepang (*Ulomoides dermestides*), *limonene*

The Effects of Giving Chinese Beetle's (*Ulomoides dermestoides*) Extract on Number of Kupffer Cells and TNF- α Expression of Hepar on Mice Wistar (*Rattus novergicus*) Streptozotocin-induced

ABSTRACT

Type 1 Diabetes mellitus (DM) is a metabolic disorder characterized by hyperglycemia due to damage to pancreatic β cells. The destruction of pancreatic β cells by the induction of streptozotocin due to the high production of ROS. High levels of glucose in the blood caused a glycation process that forms advanced glycation end products (AGEs) and trigger tissue inflammation. Limonene compounds in Chinese beetle ethanol extract serve as antioxidants and anti-inflammatory. This study was conducted to determine the effect of giving Chinese beetle's (*Ulomoides dermestoides*) extract on the number of Kupffer liver cells and TNF- α expression. The experimental animals used were 25 Wistar mice weighing \pm 200 grams divided into 5 treatment groups. Group 1 was a negative control group, group 2 was a positive control group induced by streptozotocin dose of 20 mg/KgBB for 5 days, groups 3, 4 and 5 were the treatment group induced by streptozotocin dose 20 mg/KgBB for 5 days and treated with Chinese beetle's extract using dose 2,3 mg/KgBB, 4,6 mg/KgBB, and 9,2 mg/KgBB for 14 days. The parameters observed were the number of Kupffer cells with histopathological method stained by Hematoxyline eosin and TNF- α expression by immunohistochemical method. Data analysis of this research were conducted using Analysis of Variance (ANOVA) method and continued with HSD test (Honestly Significant Difference) α -0,05. The results showed that giving of Chinese beetle's extract (*Ulomoides dermestides*) significantly ($p < 0,05$) decreased the number of Kupffer cells and TNF- α expression in streptozotocin-induced rats at a dose of 2,3 mg/KgBB, but blood glucose levels remain hyperglycemia in all treatment group.

Key Word: Diabetes mellitus, *Rattus novergicus*, TNF- α , beetle (*Ulomoides dermestides*), limonene

KATA PENGANTAR

Penulis mengucapkan puji syukur atas kehadiran Allah SWT yang telah memberikan segala nikmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Pengaruh Pemberian Ekstrak Semut Jepang (*Ulomoides dermestoides*) terhadap Jumlah Sel Kupffer dan Ekspresi TNF- α Hepar pada Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi *Streptozotocin*”**. Dalam penyusunan skripsi ini tidak lepas akan adanya bantuan serta dukungan moril dari berbagai pihak. Pada kesempatan ini penulis berterima kasih kepada :

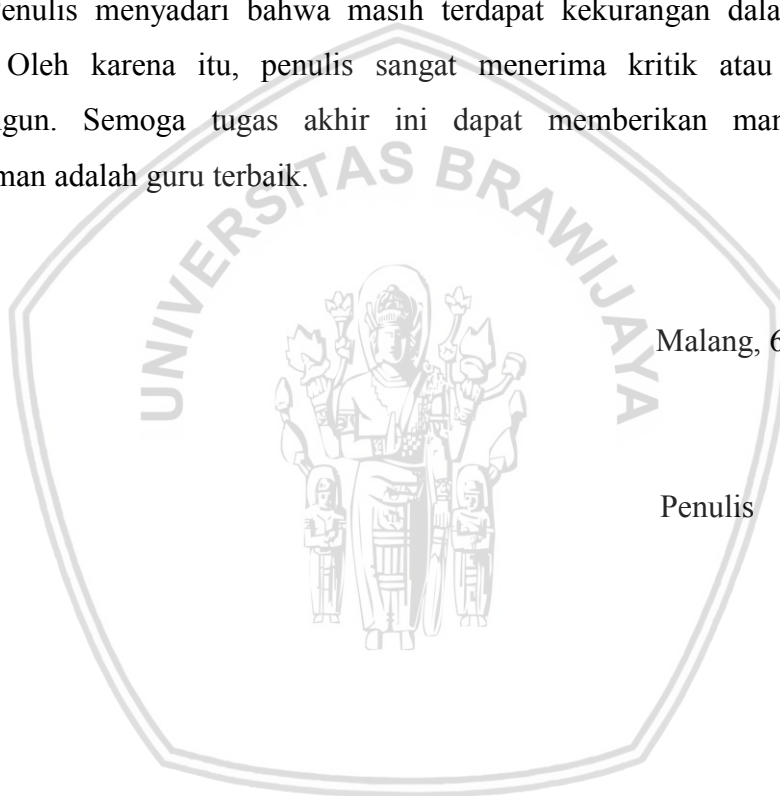
1. Prof. Ir. Hendrawan S., M. Rur. Sc. Ph. D selaku dosen pembimbing I atas bimbingan, kesabaran, fasilitas, dan waktu yang telah diberikan.
2. drh.Viski Fitri Hendrawan, M. Vet selaku dosen pembimbing II atas bimbingan, kesabaran, fasilitas, dan waktu yang telah diberikan.
3. drh. Aldila Noviatry, M. Biomed selaku dosen penguji I yang telah memberikan kritik, saran dan masukan yang sangat membangun.
4. drh. Albiruni Haryo, M. Sc selaku dosen penguji II yang telah memberikan kritik, saran dan masukan yang sangat membangun.
5. Prof. Dr. Aulanni'am, drh. DES selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
6. Ayahanda Sugeng Riyanto, Ibunda Lilis Setiyowati, Mbah Bapak, Mbah Ibu, Kakak Ayang Setiyo Putri dan Adik Danang Eka Satriya untuk kasih sayang, doa, semangat serta dukungan dan pengorbanan baik moril maupun materi selama ini.
7. Sahabat tersayang Rizky Dwi Lestari dan Feby Rahma Satya Saraswati yang selalu memberikan dukungannya baik suka maupun duka.
8. Tim Lulus, Dion Santanu Murti, Andre Giovanni dan Fitri Umi yang selalu ada dalam kondisi apapun.
9. Teman-teman kelas 2014 C yang telah memberikan persahabatan, semangat, inspirasi, keceriaan dan mimpi-mimpi yang luar biasa.

10. Teman-teman seperjuangan mahasiswa Fakultas Kedokteran Hewan angkatan 2014 (AVENGERS) yang telah memberikan semangat dan dukungan kepada penulis.
11. Seluruh staf dan karyawan FKH, yang telah membantu jalannya proses administrasi dalam membuat tugas akhir.
12. Semua pihak yang telah membantu dalam pelaksanaan dan penyusunan skripsi ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa masih terdapat kekurangan dalam penulisan skripsi. Oleh karena itu, penulis sangat menerima kritik atau saran yang membangun. Semoga tugas akhir ini dapat memberikan manfaat karena pengalaman adalah guru terbaik.

Malang, 6 Agustus 2018

Penulis



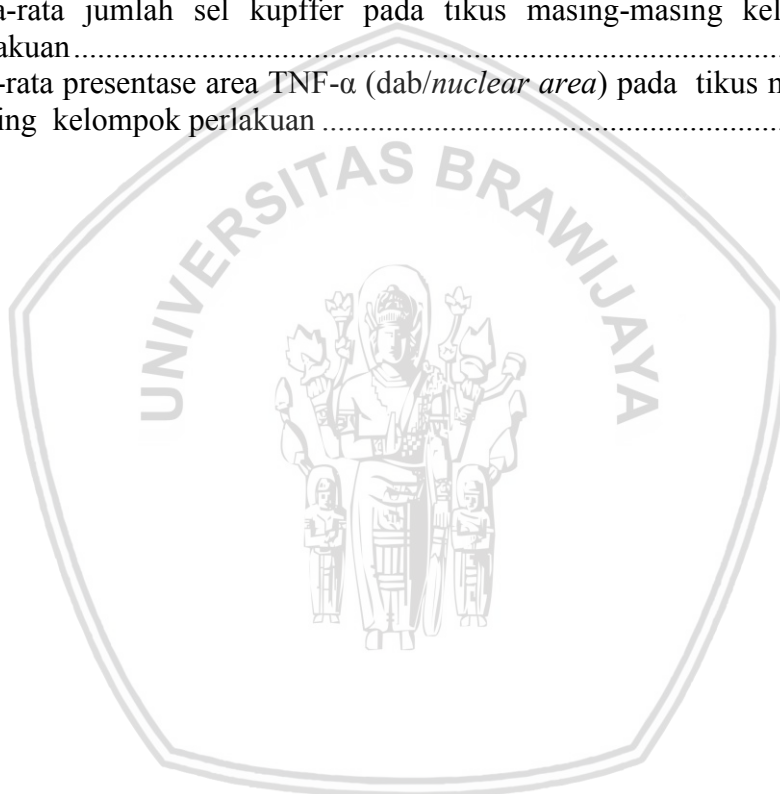
DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR.....	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG	xiv
 BAB 1 PENDAHULUAN	 1
1.1 Latar belakang	1
1.2 Rumusan masalah.....	3
1.3 Batasan masalah	4
1.3 Tujuan	5
1.4 Manfaat	5
 BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	 6
2.1 <i>Ulomoides dermestoides</i>	6
2.1.1 Komposisi <i>Ulomoides dermestoides</i>	7
2.2 <i>Limonene</i>	8
2.3 Diabetes Melitus	10
2.4 Hepar	12
2.4.1 Metabolisme Glukosa pada Hepar	14
2.4.2 Mekanisme Hiperglikemia Menyebabkan Kerusakan Hepar dan Menginduksi TNF- α	16
2.5 Sel Kupffer	16
2.6 <i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>	18
2.7 <i>Streptozotocin</i>	19
2.7.1 Mekanisme <i>Streptozotocin</i> Menginduksi Kerusakan sel β Pankreas	20
2.8 Hewan Coba Tikus Putih (<i>Rattus novergicus</i>)	21
 BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESA PENELITIAN	 24
3.1 Kerangka konsep	24
3.2 Hipotesis penelitian	28
 BAB 4 METODE PENELITIAN.....	 29
4.1 Waktu dan tempat penelitian	29

4.2 Alat dan bahan	29
4.3 Tahapan penelitian	31
4.4 Prosedur kerja	32
4.4.1 Rancangan Penelitian dan Persiapan Hewan Coba	32
4.4.2 Pembuatan Hewan Coba Diabetes Melitus 1	33
4.4.3 Pembuatan dan Perhitungan Dosis Ekstrak Semut Jepang (<i>Ulomoides dermestoides</i>)	34
4.4.4 Pemeriksaan Kadar Glukosa Darah	35
4.4.5 Pemberian Ekstrak Semut Jepang (<i>Ulomoides dermestoides</i>) ..	36
4.4.6 Isolasi Organ Hepar	36
4.4.7 Pembuatan Preparat Histologi Hepar dengan Pewarnaan HE...	37
4.4.8 Pembuatan Preparat Histologi Hepar dengan Pewarnaan Imunohistokimia	39
4.4.9 Perhitungan Jumlah Sel Kupffer Hepar	40
4.4.10 Perhitungan Ekspresi Imunohistokimia TNF- α Hepar	41
4.5 Analisa Data	41
BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN	42
5.1 Perhitungan Kadar Glukosa Hewan Coba	42
5.2 Pengaruh Pemberian Ekstrak Semut Jepang (<i>Ulomoides</i> <i>dermestoides</i>) Terhadap Jumlah Sel Kupffer	47
5.3 Pengaruh Pemberian Ekstrak Semut Jepang (<i>Ulomoides</i> <i>dermestoides</i>) Terhadap Ekspresi TNF- α	56
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN	62
6.1 Kesimpulan	62
6.2 Saran	62
DAFTAR PUSTAKA	63
LAMPIRAN	70

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1 Komposisi <i>u. dermestoides</i> dengan menggunakan ekstraksi etanol	8
4.1 Desain kelompok penelitian	32
5.1 Rata-rata kadar glukosa darah, jumlah sel kupffer dan ekspresi TNF- α pada hewan coba	43
5.1 Histopatologi hepar tikus (<i>rattus novergicus</i>) pewarnaan HE perbesaran 400x.....	48
5.2 Rata-rata jumlah sel kupffer pada tikus masing-masing kelompok perlakuan.....	50
5.3 Rata-rata presentase area TNF- α (dab/nuclear area) pada tikus masing-masing kelompok perlakuan	58



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 <i>Uromoides dermestoides</i>	7
2.2 Struktur kimia <i>limonene</i>	9
2.3 Anatomi hepar terdiri dari lobus dexter, lobus sinister, lobus quadratus dan lobus caudatus	13
2.4 Gambar histopatologi hepar	14
2.5 Proses regulasi glukosa darah oleh hormon insulin dan hormon glukagon	15
2.6 Gambar histologi sel kupffer yang terletak pada sinuosid hepar	18
2.7 Tikus putih (<i>rattus novrgicus</i>) strain wistar	23
3.1 Kerangka konseptual	24
5.1 Histopatologi hepar tikus (<i>rattus novergicus</i>) pewarnaan HE perbesaran 400x	48
5.2 Ekspresi TNF- α tikus (<i>rattus novergicus</i>) pewarnaan IHK perbesaran 400x	57



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Surat Laik Etik	71
2. Determinasi Semut Jepang	72
3. Surat Keterangan Ekstraksi	73
4. Skema Penelitian	74
5. Perhitungan Dosis <i>Streptozotocin</i>	75
6. Pembuatan Ekstrak Semut Jepang (<i>Ulomoides dermestoides</i>)	76
7. Perhitungan Dosis Pemberian Ekstrak semut jepang (<i>Ulomoides dermestoides</i>).....	77
8. Pembuatan Preparat Histologis ginjal dengan Pewarnaan HE	79
9. Metode Imunohistokimia	80
10. Perhitungan Jumlah Sel Kupffer Hepar	81
11. Perhitungan Ekspresi TNF- α Hepar	83
12. Hasil Analisa Statistika Jumlah Sel Kupffer Hepar	85
13. Hasil Analisa Statistika Ekspresi TNF- α Hepar	89
14. Perhitungan Persentase Peningkatan dan Penurunan Jumlah Sel Kupffer Hepar	93
15. Perhitungan Persentase Peningkatan dan Penurunan Presentase Area TNF- α Hepar	94
16. Perhitungan Kadar Glukosa Darah	95
17. Analisa Statistika Kadar Glukosa Darah	98

DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

AGEs	: <i>Advanced glycation end products</i>
BB	: Berat badan
BNJ	: Beda nyata jujur
DM	: Diabetes melitus
Kg	: Kilogram
GLUT	: <i>Glucose transporter</i>
HIV	: <i>Human immunodeficiency virus</i>
IL-1 β	: Interleukin satu beta
IL-6	: Interleukin 6
IP	: <i>Intraperitoneal</i>
IV	: <i>Intravena</i>
mg	: Milligram
NF κ B	: <i>Nuclear Factor Kappa B</i>
PBS	: <i>Phosphate buffer saline</i>
PMN	: <i>Polymorphonuclear</i>
RAGE	: <i>Receptor of Advanced Glycation End Product</i>
ROS	: <i>Reactive oxygen species</i>
RNI	: <i>Reactive nitrogen intermediate</i>
STZ	: <i>Streptozotocin</i>
TNF- α	: <i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>
U.	: <i>Uromyces</i>
UPHP	: Unit Pengembangan Hewan Percobaan
WHO	: <i>World Health Organization</i>
β	: Beta
%	: Persen
/	: Atau
\pm	: Kurang lebih
$^{\circ}\text{C}$: Derajat celsius

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Diabetes mellitus tipe 1 merupakan penyakit endokrin kronis yang disebabkan oleh kerusakan pada sel β pankreas sehingga terjadi defisiensi insulin yang berfungsi untuk mengontrol kadar glukosa dalam darah (Aji, 2011). Penyakit DM tipe 1/*Insulin Dependent/Juvenile-onset diabetes mellitus* ditandai dengan kondisi hiperglikemia (peningkatan kadar glukosa dalam darah), gejala klinis yang ditunjukkan diantaranya adalah *polyuria*, *polydipsia*, *polyphagia*, kehilangan berat badan dan kulit yang rentan terhadap infeksi (Kemenkes, 2014).

Kejadian penyakit DM tidak hanya terjadi pada manusia, akan tetapi juga pada hewan seperti anjing dan kucing. Penyakit DM tipe 1 lebih sering terjadi pada hewan dibandingkan penyakit DM tipe 2, beberapa faktor yang menyebabkan timbulnya penyakit DM tipe 1 pada hewan anjing dan kucing diantaranya adalah pengaruh genetik, pengaruh lingkungan, inflamasi dan adanya destruksi *immune-mediated* pada organ pankreas. Ras anjing yang rentan terserang penyakit ini adalah ras *Keeeshonds* dan *Samoyeds* sedangkan ras kucing yang rentan terserang adalah *Norwegian Forest Cats*, *Russian Blues* dan *Abyssinians*, pada kucing ras *Persian* resiko terserang lebih kecil (Maggiore, 2014; O'Neill *et al.*, 2016). Prevalensi penyakit DM tipe 1 pada anjing di *United Kingdom* yaitu 0.34% pada umur 5-12 tahun (Mattin *et al.*,

2014; Catchpole *et al.*, 2007). Pada kucing prevalensi penyakit ini pada tahun 2016 yaitu 0.58% (O'Neill *et al.*, 2016).

Penyakit DM tipe 1 terjadi akibat kerusakan pada sel β pankreas yang berfungsi menghasilkan hormon insulin yang berperan dalam mengatur kadar glukosa darah. Penurunan hormon insulin, akan meningkatkan kadar glukosa dalam darah yang berakibat pada peningkatan proses glikasi (Ünal *et al.*, 2012). Proses glikasi merupakan reaksi non enzimatis yang menyebabkan terjadinya ikatan antara glukosa dengan protein plasma membentuk radikal bebas yaitu *advanced glycation end products* (AGEs) yang bersifat glikotoksin dan memicu respon imun jaringan (Singh *et al.*, 2014).

TNF- α merupakan sitokin pro-inflamasi mayor yang dihasilkan oleh hepatosit dan sel Kupffer pada hepar. Fungsi utama dari TNF- α adalah menginisiasi terjadinya apoptosis. Hingga saat ini terapi yang digunakan untuk pengobatan penyakit DM tipe 1 adalah dengan menyuntikkan insulin ke dalam tubuh pasien. Kelemahan dari terapi ini adalah membutuhkan biaya yang relatif mahal, oleh sebab itu dilakukan berbagai pengembangan pengobatan alternatif dengan memanfaatkan bahan-bahan herbal. Keuntungan menggunakan terapi herbal adalah memiliki efek samping yang relatif kecil karena bersifat lebih alami dibandingkan terapi dengan menggunakan pengobatan kimia (Octarini, 2010).

Semut jepang (*Ulomoides dermestoides*) banyak dimanfaatkan oleh masyarakat untuk pengobatan alternatif penyakit diabetes dengan cara mengkonsumsi secara langsung. *Ulomoides dermestoides* yang diekstraksi

dengan menggunakan metode maserasi pelarut etanol akan menghasilkan beberapa senyawa kimia aktif, seperti *alpha-pinene*, *alpha-terpinene*, *beta-phellandrene*, *limonene*, *methyl mystritate*, *methyl palmitate*, *methyl linoleate*, *methyl oleate*, *methyl stearate* dan *pentadecanol*. Senyawa *limonene* terdapat sebanyak 17.15% dapat berfungsi sebagai antiinflamasi dan antioksidan. *Limonene* sebagai agen antiinflamasi akan menekan ekspresi dari sitokin pro-inflamasi seperti TNF- α , IL-1 β dan IL-6 (Mendoza-Moza *et al.*, 2013) yang dihasilkan oleh sel Kupffer hepar akibat pembentukan *advanced glycation end products* (AGEs) yang bersifat glikotoksin dan memicu terjadinya respon inflamasi pada hepar (Uribarri *et al.*, 2010). *Limonene* sebagai antioksidan mampu menurunkan produksi *reactive oxygen species* (ROS) dan menghambat kerusakan pada sel β pankreas (Mendoza-Moza *et al.*, 2013)

Dilatar belakang oleh data tersebut peneliti ingin mengetahui pengaruh pemberian ekstrak semut jepang (*Ulomoides dermestoides*) terhadap jumlah sel Kupffer dan ekspresi TNF- α hepar pada hewan coba tikus Wistar yang diinduksi *streptozotocin*.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana pengaruh pemberian ekstrak semut jepang (*Ulomoides dermestoides*) terhadap jumlah sel Kupffer pada tikus Wistar (*Rattus novergicus*) model DM tipe 1 yang diinduksi oleh *streptozotocin*?

2. Bagaimana pengaruh pemberian ekstrak semut jepang (*Ulomoides dermestoides*) terhadap ekspresi TNF- α hepar pada tikus Wistar (*Rattus novergicus*) model DM tipe 1 yang diinduksi oleh *streptozotocin*?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan diatas, maka penelitian ini dibatasi pada:

1. Hewan model yang digunakan untuk penelitian adalah tikus Wistar (*Rattus novergicus*) berjenis kelamin jantan dengan berat badan ± 200 gram berumur 8-12 minggu yang diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan (UPHP) Universitas Brawijaya Malang, penelitian yang dilakukan telah mendapatkan sertifikat kelaikan etik (*Ethical Clearance*) Universitas Brawijaya, No:881-KEP-UB.
2. *Streptozotocin* (STZ) yang digunakan untuk menginduksi DM tipe 1 diperoleh dari Laboratorium Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang diinjeksikan secara intraperitoneal dengan dosis 20 mg/KgBB selama 5 hari secara berturut-turut.
3. Semut jepang (*Ulomoides dermestoides*) diperoleh dari peternak semut jepang yang ada di Bandung dan sudah dideterminasi di Laboratorium Ekologi dan Diversitas Hewan Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya. Dosis ekstrak semut jepang (*Ulomoides dermestoides*) yang digunakan adalah 2.3 mg/KgBB (dosis 1), 4.6 mg/KgBB (dosis 2) dan 9.2 mg/KgBB (dosis 3).

4. Variabel yang diamati adalah jumlah sel Kupffer dengan menggunakan pewarnaan *Hematoxylin eosin* dan ekspresi TNF- α dengan menggunakan pewarnaan imunohistokimia.

1.4 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak semut jepang (*Ulomoides dermestoides*) terhadap jumlah sel Kupffer pada tikus Wistar (*Rattus novergicus*) model DM tipe 1 yang diinduksi oleh *streptozotocin*.
2. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak semut jepang (*Ulomoides dermestoides*) terhadap ekspresi TNF- α hepar pada tikus Wistar (*Rattus novergicus*) model DM tipe 1 yang diinduksi oleh *streptozotocin*.

1.5 Manfaat Penelitian

1. Manfaat Teoritis

Penelitian yang dilakukan oleh penulis dapat dijadikan dasar untuk mengolah semut jepang (*Ulomoides dermestoides*) menjadi fitofarmaka yang bermanfaat untuk penyakit DM tipe 1.

2. Manfaat aplikatif

Penelitian yang dilakukan oleh penulis dapat memberikan informasi mengenai pengaruh pemberian ekstrak semut jepang (*Ulomoides dermestoides*) terhadap jumlah sel Kupffer dan ekspresi TNF- α hepar pada tikus Wistar (*Rattus novergicus*) model DM tipe 1 yang diinduksi *streptozotocin*.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Ulomoides dermestoides*

Ulomoides dermestoides merupakan salah satu insekta dari famili *Tenebrionidae* yang tersebar di seluruh dunia dan banyak ditenakkan oleh masyarakat Argentina dan Amerika Selatan untuk dikonsumsi secara langsung dalam keadaan hidup sebagai pengobatan alternatif beberapa jenis penyakit yaitu asthma, psoriasis, vitiligo, penyakit kulit kronis, Parkinson's, diabetes, arthritis dan kanker (Crespo *et al.*, 2011). Masyarakat di Asia menggunakan insekta ini sebagai *aphrodisiac* dan bahan terapeutik (Mendoza-Meza, 2016).

Menurut Mendoza-Meza (2016), taksonomi dari *Ulomoides dermestoides* adalah sebagai berikut:

Kerajaan : *Animalia*
Divisi : *Arthropoda*
Kelas : *Insecta*
Ordo : *Coleoptera*
Famili : *Tenebrionidae*
Genus : *Ulomoides*
Spesies : *Ulomoides dermestoides*

Ulomoides dermestoides/Martianers dermestoides/Palembus dermestoides atau biasa disebut juga dengan *peanut beetle/peanut pest* sering ditemukan pada beberapa jenis komoditi biji-bijian seperti kacang, jagung, sorgum, beras dan kedelai. Jenis insekta ini diketahui memiliki beberapa zat

yang di sekresikan oleh glandula sekretori abdominal untuk pertahanan tubuh yaitu methyl-1,4-benzoquinone, ethyl-1,4-benzoquinone dan 1-pentadence yang bersifat sitotoksik dan genotoksik yang larut dalam ekstraksi dengan menggunakan pelarut *dichloromethane*. Melalui ekstraksi dengan menggunakan pelarut etanol, *Ulomoides dermestoides* akan menghasilkan beberapa senyawa kimia aktif, yaitu *alpha-pinene*, *alpha-terpinene*, *beta-phellandrene*, *methyl mystritate*, *methyl palmitate*, *methyl linoleate*, *methyl oleate*, *methyl stearate*, *pentadecanol* dan *limonene*. Senyawa *limonene* berfungsi sebagai antioksidan dan antiinflamasi (Morillo-Garcia *et al.*, 2016). *Ulomoides dermestoides* dapat dilihat pada **Gambar 2.1**.



Gambar 2.1 *Ulomoides dermestoides* (Qian *et al.*, 2016)

2.1.1 Komposisi *Ulomoides dermestoides*

Pemanfaatan *Ulomoides dermestoides* yang merupakan hama pada bahan makanan berupa biji-bijian sebagai obat alternatif beberapa penyakit, dikarenakan *Ulomoides dermestoides* mengandung beberapa

senyawa, salah satunya adalah *limonene* yang berfungsi sebagai zat antiinflamasi dan antioksidan. *Limonene* diketahui bertindak sebagai agen antiinflamasi dengan cara menekan ekspresi sitokin pro-inflamasi, menekan produksi *reactive oxygen species* (ROS) dan inaktivasi migrasi eosinofil. Beberapa sitokin pro-inflamasi yang dihambat ekspresinya oleh *limonene* diantaranya adalah TNF- α , IL-1 β dan IL-6 (Mendoza-Moza *et al*, 2013). Komposisi zat-zat yang terkandung dalam *Ulomoides dermestoides* dengan menggunakan ekstraksi etanol dapat dilihat pada **Tabel 2.1**.

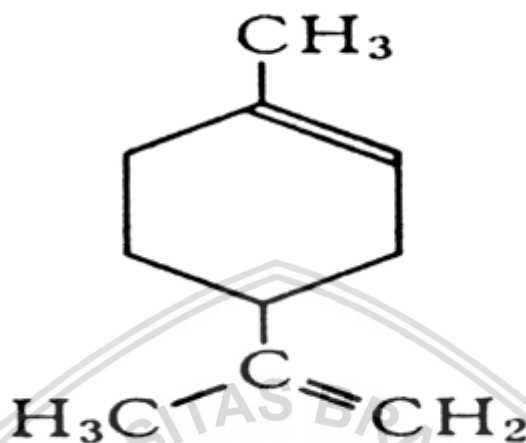
Tabel 2.1 Komposisi *Ulomoides dermestoides* dengan menggunakan ekstraksi etanol (Mendoza-Moza *et al*, 2013)

No.	Bahan	Kuantitas (%)
1.	<i>Alpha-pinene</i>	1.95
2.	<i>Apha-terpinene</i>	0.50
3.	<i>Beta-phellandrene</i>	2.10
4.	<i>Limonene</i>	17.15
5.	<i>Methyl myristate</i>	2.50
6.	<i>Methyl palmitate</i>	27.55
7.	<i>Methyl linoleate</i>	7.15
8.	<i>Methyl oleate</i>	11.45
9.	<i>Metyl stearate</i>	0.80
10.	<i>Pentadecanol</i>	28.85

1.2 *Limonene*

Limonene merupakan senyawa monoterpen berbentuk cairan bening pada suhu ruang dengan struktur kimia $C_{10}H_{16}$ **Gambar 2.2**. *Limonene* merupakan senyawa terbesar yang terdapat pada ekstrak kulit jeruk. Senyawa ini banyak dimanfaatkan sebagai pewangi makanan dan parfum yang

aman untuk dikonsumsi karena memiliki toksisitas yang rendah (Upadhayay, 2016).



Gambar 2.2 Struktur Kimia *Limonene* (Upadhayay, 2016)

Beberapa fungsi dari senyawa ini diantaranya adalah untuk *chemopreventive* dan antitumor, antiinflamasi, antioksidan dan inhibitor glikasi. Sebagai *chemopreventive* dan antitumor, *limonene* menghambat pertumbuhan dari sel tumor dengan cara menginduksi terjadinya apoptosis dengan cara mengaktifasi *growth factor beta-signling pathway*. Sebagai antiinflamasi, *limonene* bertindak menekan produksi ROS dengan cara bertindak sebagai enzim katalase, peroksidase dan superoksida dismutase *like activity* dan sebagai antioksidan dengan cara menekan ekspresi sitokin pro-inflamasi dengan cara menginaktivasi *Nuclear Factor Kappa B* (NFkB), dan menghambat migrasi eosinofil (Mendoza-Moza *et al.*, 2013; Jou *et al.*, 2008).

Limonene sebagai inhibitor protein glikasi banyak dimanfaatkan untuk mengurangi dampak negatif dari komplikasi penyakit DM. Glikasi protein meningkat pada kondisi hiperglikemia yang akan meningkatkan pembentukan

AGEs yang dapat menyebabkan komplikasi sekunder pada penyakit DM. Penggunaan *limonene* dalam jumlah yang tinggi sebagai inhibitor protein glikasi akan menyebabkan terjadinya peningkatan reduksi glukosa menjadi sorbitol yang akan dirubah menjadi fruktosa (Jagdale *et al.*, 2016). Fruktosa merupakan salah satu agen glikosilasi yang akan meningkatkan pembentukan AGEs.

Dampak negatif yang dapat ditimbulkan dari penggunaan senyawa *limonene* diantaranya adalah iritasi ringan pada kulit, bronchokonstriktif dan toksisitas pada ginjal (Silva-Abreu *et al.*, 2017).

2.3 Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus merupakan penyakit kelainan metabolik yang terjadi secara kronis dan memiliki karakteristik yaitu pada penderitanya akan mengalami kondisi hiperglikemia dan kelainan pada metabolisme karbohidrat, protein dan lemak yang diakibatkan oleh terganggunya proses produksi hormon insulin dan terganggunya kerja dari hormon insulin. Gejala klinis pada penyakit DM diantaranya adalah polifagia, polidipsi, poliuri, pandangan kabur dan penurunan berat badan tubuh, sedangkan pada penyakit DM dengan tingkat keparahan yang tinggi dapat mengakibatkan stupor, koma dan kematian (WHO, 1999).

Insulin merupakan hormon yang dihasilkan oleh sel β pankreas yang berfungsi untuk membantu glukosa masuk ke dalam sel tubuh. Peran dari hormon insulin dalam tubuh adalah mengatur metabolisme dari karbohidrat bersama dengan hormon glukagon. Efek kerja hormon insulin terhadap

karbohidrat terjadi di hampir seluruh jaringan tubuh kecuali pada otak, dengan cara meningkatkan difusi glukosa ke dalam sel tubuh dan menurunkan kadar glukosa dalam darah (Ünal *et al.*, 2012).

Menurut *American Diabetes Association* tahun 2014, penyakit DM dibagi menjadi 4 bentuk yaitu, Diabetes Mellitus tipe 1, Diabetes Mellitus tipe 2, Diabetes Mellitus tipe yang lain dan Diabetes Mellitus Gestational.

1. Diabetes Mellitus Tipe 1 (*Insulin-Dependent*)

Diabetes mellitus tipe 1 terjadi akibat adanya kerusakan sel β pada pulau Langerhans pankreas yang berfungsi untuk memproduksi hormon insulin. Penderita penyakit DM tipe 1 akan mengalami defisiensi hormon insulin sehingga glukosa darah tidak dapat memasuki sel tubuh yang menyebabkan terjadinya hiperglikemia. Kerusakan sel β dapat diakibatkan oleh penyakit autoimun yang menyebabkan destruksi sel β pankreas. Faktor genetik adalah faktor pemicu terjadinya penyakit DM tipe 1.

2. Diabetes Mellitus Tipe 2 (*Non-Insulin-Dependent*)

Diabetes mellitus tipe 2 terjadi akibat adanya resistensi terhadap insulin. Pada pasien DM tipe 2 tidak terjadi kerusakan sel β pankreas. Obesitas merupakan penyebab tertinggi terjadinya penyakit DM tipe 2, penyebab-penyebab yang lain adalah umur, rendahnya aktivitas fisik, hipertensi dan dislipidemia. Hiperglikemia terjadi secara bertahap, sehingga pada tahap awal penyakit sulit untuk mendeteksi adanya penyakit DM. Resistensi akan mengalami penurunan dengan pengobatan dan adanya penurunan berat badan pada penderita yang mengalami obesitas.

Ketoasidosis dapat terjadi secara spontan pada penderita apabila dipicu oleh stress dan adanya infeksi.

3. Diabetes Mellitus Tipe yang Lain

Diabetes mellitus tipe yang lain dapat terjadi akibat dari beberapa kondisi seperti defek genetik sel β , defek genetik aksi insulin, penyakit pada pankreas (pankreatitis, pankreatektomi, trauma, infeksi dan karsinoma pankreatik), endokrinopati, infeksi dan induksi dari bahan kimia serta obat-obatan.

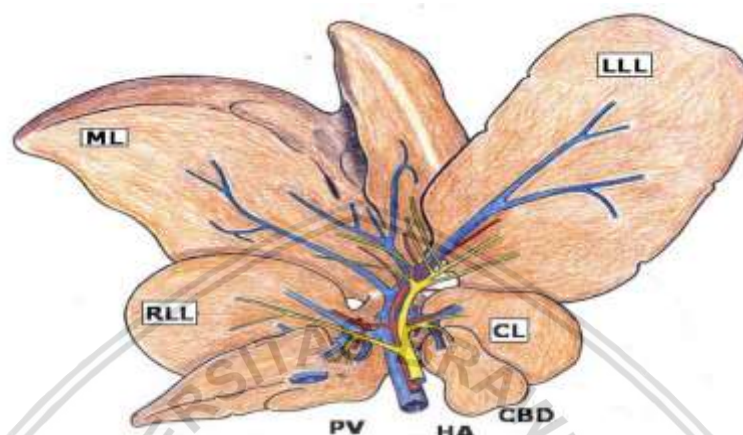
4. Diabetes Mellitus Tipe Gestasional

Diabetes gestasional merupakan glukosa intoleran yang terjadi selama masa kehamilan. Pada masa kehamilan produksi hormon estrogen, progesteron, kortisol diproduksi oleh tubuh untuk meningkatkan nutrisi dan glukosa darah dan memiliki efek resistensi terhadap hormon insulin. Apabila, tubuh tidak memproduksi hormon insulin dalam jumlah yang tinggi maka sel tubuh akan lebih resisten terhadap insulin.

1.4 Hepar

Hepar merupakan kelenjar pencernaan dengan ukuran yang paling besar, yang berfungsi untuk penyimpanan nutrisi dan tempat produksi cairan empedu yang tersimpan dalam *gallbladder*. Empedu akan ditransportasikan ke dalam duodenum melalui *bile ductus*, yang berfungsi untuk memecah zat makanan yang terdapat pada duodenum pada saat proses pencernaan (Vaisi *et al.*, 2017). Hepar memiliki beberapa fungsi yaitu metabolisme karbohidrat, lemak, protein

dan vitamin, detoksifikasi, fagositosis, imunitas, hemodinamik dan fungsi eksokrin dengan cara menghasilkan cairan empedu. Hepar terdiri atas lobus dexter, lobus sinister, lobus quadratus dan lobus caudatus (Ajeng, 2017).



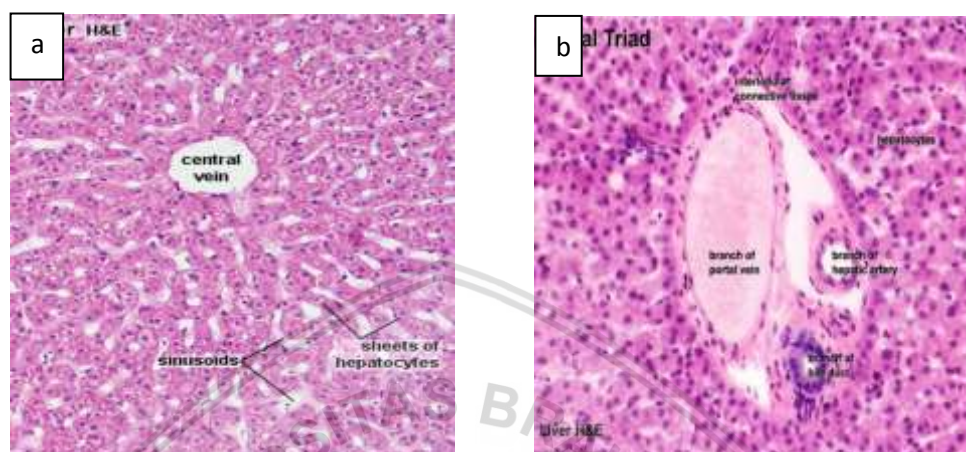
Gambar 2.3 Anatomi hepar pada tikus yang tersusun atas *median lobus* (ML), *left lateral lobus* (LLL), *caudate lobus* (CL), *right lateral lobus* (RLL), *common bile duct* (CBD), *hepatic artery* (HA) dan *portal vein* (PV) (Aller *et al.*, 2008)

Tikus tidak memiliki *gallbladder* (*ductus choleoductus*). Sistem *biliary* disusun oleh *ductus hepaticus dexter et sinister* yang berfusi dan membentuk *ductus hepaticus communis* menuju duodenum (Vdoviakova *et al.*, 2016).

Hepar tersusun atas beberapa sel yaitu hepatosit $\pm 60\%$, sel epitelial, sel Kupffer dan sel stellata. Secara mikroskopis hepar tersusun atas lobulus-lobulus dengan bentuk heksagonal. Di bagian *central* lobulus terdapat v. sentralis yang dikelilingi oleh hepatosit dan sinusoid yang tersusun radier kearah lateral. Terdapat kanalis porta/Trigonum Kiernann yang terletak diantara dua lobulus yang berdekatan yang tersusun atas a. hepatica, v. porta dan *ductus biliary*. Unit fungsional hepar tersusun atas lobulus dan kanalis porta. Trigonum Kiernann merupakan jaringan pengikat berbentuk segitiga yang tersusun atas pembuluh

darah, pembuluh limfe, saluran empedu dan serabut saraf (Ajeng, 2017).

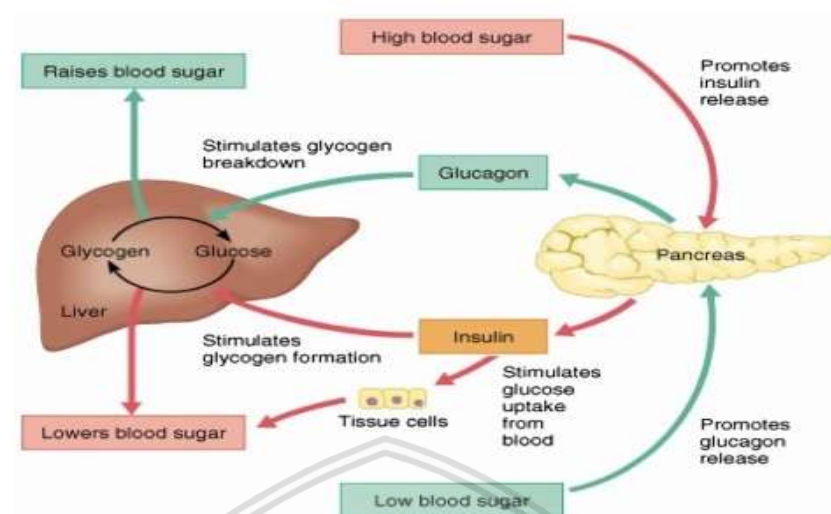
Gambaran histologi hepar dapat dilihat pada **Gambar 2.3**.



Gambar 2.4 Gambar histologi hepar **a.** Gambaran histologi lobulus hepar dengan pewarnaan HE **b.** Gambaran histologi Trigonum Kiernann dengan pewarnaan HE (Ajeng, 2017)

2.4.1 Metabolisme Glukosa pada Hepar

Hepatosit menyerap glukosa darah difasilitasi oleh GLUT-2. GLUT-2 merupakan *glucose transporter* yang terdapat pada hepar, sel- β pankreas dan ginjal. Ekspresi GLUT-2 pada hepar dipengaruhi oleh konsentrasi glukosa darah dan insulin. Pada pasien DM tipe 1 yang mengalami hiperglikemia ekspresi GLUT-2 mengalami peningkatan, dengan injeksi insulin ke dalam tubuh dapat menurunkan ekspresi dari GLUT-2. Glukosa dalam hepar akan disimpan dalam bentuk glikogen sebagai sumber cadangan makanan (Regnell *et al.*, 2012). Proses regulasi glukosa darah oleh hormon insulin dan hormon glukagon dapat dilihat pada **Gambar 2.4**.



Gambar 2.5 Proses regulasi glukosa darah oleh hormon insulin dan hormon glukagon (Qaid *et al.*, 2016)

Pembentukan glikogen dalam hepar di stimulasi oleh hormon insulin. Pada saat tubuh mengalami hipoglikemia, glikogen akan dirubah menjadi glukosa darah oleh hormon glukagon. Glukagon merubah glikogen mejadi glukosa melalui mekanisme glikogenolisis (Qaid *et al.*, 2016; Regnell *et al.*, 2012).

1.4.2 Mekanisme Hiperglikemia Menyebabkan Kerusakan Hepar dan Menginduksi TNF- α

Pada pasien penyakit DM tipe 1 akan mengalami kondisi hiperglikemia karena defisiensi hormon insulin dalam tubuh. Peningkatan glukosa darah akan mengakibatkan terjadinya oksidasi antara glukosa dengan protein dan menghasilkan radikal bebas berupa *advance glycation end product* (AGEs) (Regnell *et al.*, 2012).

Pada keadaan hiperglikemia, glukosa akan berikatan dengan plasma protein, lemak dan asam nukleat melalui reaksi non-enzimatis

melalui proses yang disebut dengan reaksi glikasi/Maillard/browning. Proses glikasi akan menghasilkan *advanced glycation end products* (AGEs) (Singh *et al.*, 2014). AGEs atau juga disebut dengan glikotoksin merupakan senyawa oksidan yang normal terjadi dalam tubuh. Peningkatan pembentukan AGEs akibat tingginya kadar glukosa darah akan bersifat patogen bagi jaringan. Efek patologi dari AGEs dikarenakan oleh kemampuan AGEs dalam memicu stres oksidatif dan inflamasi (Uribarri *et al.*, 2010).

Sel Kupffer merupakan makrofag jaringan pada hepar yang jumlahnya akan mengalami peningkatan apabila terjadi inflamasi pada hepar. Salah satu respon inflamasi adalah terbentuknya sitokin pro-inflamasi TNF- α . Inflamasi yang terjadi pada hepar akan mengaktifasi TNF- α *converting enzyme* yang berfungsi untuk mengkatalisis prekursor TNF- α menjadi TNF- α , sehingga terjadi peningkatan produksi TNF α (Yang *et al.*, 2016). Pada hepar TNF- α disekresikan oleh hepatosit dan sel Kupffer. TNF- α dapat menginisiasi terjadinya apoptosis pada hepatosit dengan cara merubah permeabilitas dari mitokondria (Jou *et al.*, 2008).

2.5 Sel Kupffer

Sel Kupffer merupakan makrofag pada hepar yang terdapat pada permukaan luminal atau di dalam endotelial hepatic sinusoid. Sel kupffer berperan sebagai bagian dari sistem imun pada hepar dengan cara memfagosit

benda asing, toksik, serta agen infeksi dan melepaskan mediator inflamasi. Sel Kupffer merupakan komponen kritikal sistem fagosit mononuklear yang berperan, baik dalam hepatic maupun sistemik respon terhadap patogen (Dixon *et al.*, 2013).

Sel Kupffer mampu merespon terhadap rangsangan inflamasi dan mensekresikan sitokin-sitokin serta memiliki kemampuan fagositik untuk mencerna mikroorganisme dan debris sel. Populasi sel Kupffer di hepar mencapai 15% dari populasi sel-sel yang menyusun hepar. Distribusi sel Kupffer dalam hepar dibagi menjadi 3 zona yaitu zona periportal, zona tengah (*midzonal*) dan zona perisentral. Dari ketiga zona tersebut, sel Kupffer banyak ditemukan pada daerah periportal lobulus hati. Sel Kupffer memiliki ukuran yang besar dengan sitoplasma yang bercabang serta batas sel yang tidak jelas. Nukleus dari sel Kupffer sering tidak terlihat dan tertutup oleh partikel-partikel asing yang difagosit (Wangko, 2012).

Aliran darah porta akan melewati sinusoid sebelum memasuki v. sentralis. Pada saat melewati sinusoid, partikel-partikel asing dan agen infeksius dalam darah akan difagosit oleh sel Kupffer. Proses fagositosis oleh sel Kupffer dilakukan dengan mekanisme endositosis. Perubahan aktivitas dari sel Kupffer berhubungan dengan tahapan dan keparahan dari suatu penyakit maupun agen infeksi. Peningkatan jumlah sel Kupffer dapat dipengaruhi oleh beberapa keadaan diantaranya adalah obat-obatan yang menginduksi kerusakan hepar, toksin yang menginduksi terjadinya fibrosis dan adanya

inflamasi yang terjadi pada hepar (Dixon *et al.*, 2013). Gambaran histologi sel Kupffer dapat dilihat pada **Gambar 2.5**



Gambar 2.6 Gambar histologi sel Kupffer yang terletak pada sinusoid hepar (Wangke, 2012)

2.6 Tumor Necrosis Factor Alpha

Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) merupakan salah satu sitokin pro-inflamasi yang berperan penting dalam regulasi respon terhadap inflamasi. TNF memiliki aktivitas biologi yang luas, salah satu fungsi utamanya adalah bersifat sitotoksik terhadap tumor *cell lines*. TNF- α terutama diproduksi oleh sel monosit dan makrofag, akan tetapi beberapa sel lain seperti sel limfosit, sel limfosit T dan fibroblast juga memproduksi TNF- α . TNF- α merupakan sitokin pro-inflamasi mayor yang terbentuk pada saat tahap awal inflamasi, yang akan memicu beberapa molekul inflamasi lainnya. Beberapa molekul yang dipicu oleh TNF- α adalah kemotaktik sitokin, kemokin, *reactive oxygen spesies* (ROS) dan *reactive nitrogen intermediat* (RNI) (Vasanthi *et al.*, 2007).

Karakteristik dari TNF- α adalah memiliki kemampuan dalam menginduksi apoptosis sel tumor. TNF- α merupakan salah satu sitokin yang

berperan dalam proses inflamasi yang berfungsi menginisiasi dan mengaktivasi sel PMN, sehingga sel PMN dapat mencapai target infeksi. TNF- α juga memiliki fungsi tambahan yang menguntungkan bagi tubuh yaitu berperan sebagai respon imun terhadap infeksi bakteri, virus, jamur dan invasi parasit (Supit dkk., 2015).

2.7 Streptozotocin

Streptozotocin (STZ) merupakan senyawa diabetogenik yang dihasilkan oleh bakteri gram positif *Streptomyces achromogenes* yang berperan sebagai antibakteri *broad spectrum*. STZ menginduksi diabetes mellitus pada hewan coba dengan cara merusak sel-sel yang menghasilkan insulin pada pankreas yaitu sel β yang terletak pada pulau Langerhan. Fungsi biologis STZ adalah sebagai antibiotik, sel β sitotoksik, dan onkolitik. STZ dimanfaatkan sebagai antineoplastik antibiotik untuk pengobatan tumor sel islet pankreas atau malignan insulinoma (Goud *et al.*, 2015). *Streptozotocin* merupakan senyawa *glucosamine-nitrosurea* yang bersifat merusak DNA sel dan toksik untuk sel β pankreas (Rosol *et al.*, 2013)

STZ dapat diadministrasikan dengan dua cara yaitu secara intravena (IV) dan intraperitoneal (IP). Teknik IP lebih banyak dilakukan untuk menginduksi hewan coba DM 1 karena lebih mudah dan lebih cepat. Injeksi secara IP dapat dilakukan dengan dua cara yaitu dengan menggunakan *single high dose* atau *multiple low dose*. Dosis untuk *single high dose* bervariasi antara 100-220 mg/kg BB secara IP, sedangkan untuk IV dosis yang digunakan adalah 40-60 mg/kgBB (Goud *et al.*, 2015). *Multiple low dose* dilakukan selama 5 hari dengan

menggunakan dosis 20 mg/kgBB (Aullania'am *et al.*, 2005). Pengenceran STZ digunakan larutan buffer sitrat dengan menggunakan pH 4.5 dan harus segera diinjeksikan ke tubuh hewan dalam kurun waktu 15-20 menit (Sviglerova *et al.*, 2015; Goud *et al.*, 2015).

2.7.1 Mekanisme *Streptozotocin* Menginduksi Kerusakan Sel β Pankreas

STZ merupakan senyawa nitrosurea yang bersifat *hydrophilic*, sehingga difusi ke dalam membran plasma *phospholipid bilayer* sangat terbatas. Bagian *2-deoxy glucose* yang terdapat pada STZ memiliki struktural yang analog dengan glukosa, yang akan secara selektif memasuki sel β pankreas melalui *glucose transporter* (GLUT-2). GLUT-2 juga terdapat pada organ hepar dan ginjal, sehingga pada hewan model DM yang diinduksi dengan menggunakan STZ akan mengalami kerusakan (Sviglerova *et al.*, 2015).

Streptozotocin sebagai senyawa *nitrosurea* potensial sebagai donor NO yang dapat menyebabkan kerusakan pada sel dengan cara merusak DNA sel dan menurunkan produksi ATP. *Nitric Oxide* yang merupakan *reactive nitrogen species* (RNS), di dalam mitokondria, NO akan mereduksi dan mengoksidasi bagian *binuclear* dari enzim *cythochrom c oxidase* yang menyebabkan enzim terinaktivasi. *Cythochrom c oxidase* merupakan enzim yang berperan dalam transport elektron pada tahap akhir transport elektron dengan produk akhir H₂O, inaktivasi dari enzim ini menyebabkan peningkatan produksi ROS (O₂⁻

dan H_2O_2) (Sarti *et al.*, 2000; Srinivasan *et al.*, 2012; Schull *et al.*, 2015). ROS menyebabkan kerusakan pada enzim aconitase dengan cara merusak gugus Fe-S pada enzim (Cantu *et al.*, 2009). Aconitase merupakan enzim yang mengandung gugus Fe-S dan berfungsi untuk mengkatalisis sitrat menjadi isositrat pada siklus Krebs (Doi *et al.*, 2014). Turunnya jumlah enzim aconitase berakibat pada turunnya produksi ATP yang mengakibatkan kerusakan pada sel (Goud *et al.*, 2015).

ROS juga dapat menyebabkan kerusakan pada sel dengan cara menginaktivasi enzim ribonukleotida reduktase yang berfungsi untuk menyuplai prekursor *deoxyribonucleotida* yang berfungsi untuk sintesis dan *repair* DNA sel. Turunnya aktivitas dari enzim ribonukleotida reduktase akan menyebabkan kematian pada sel (Shao *et al.*, 2005).

Kerusakan sel β pankreas akibat induksi dari *streptozotocin* akan memicu makrofag dan sel dendritik dan merangsang reaksi inflamasi. Infiltrasi sel makrofag akan menyekresikan sitokin pro-inflamasi salah satunya adalah sitokin pro-inflamasi TNF- α (Supit dkk., 2015).

2.8 Hewan Coba Tikus Putih (*Rattus novergicus*)

Hewan coba merupakan hewan yang dipelihara dan ditenakan untuk dimanfaatkan sebagai hewan model dengan tujuan untuk mempelajari dan mengembangkan pengetahuan melalui kegiatan penelitian. Tikus putih (*Rattus novergicus*) merupakan salah satu hewan coba yang sering digunakan untuk kegiatan penelitian karena memiliki kecocokan DNA dengan manusia hingga

99%. Berat badan tikus jantan dewasa mencapai 450-520 gram, sedangkan pada tikus betina mencapai 250-300 gram dengan masa hidup berkisar antara 2.5-3.5 tahun (Alexandru, 2011).

Menurut Patrick dan Regine tahun (2001), taksonomi dari tikus putih (*Rattus novergicus*) adalah sebagai berikut:

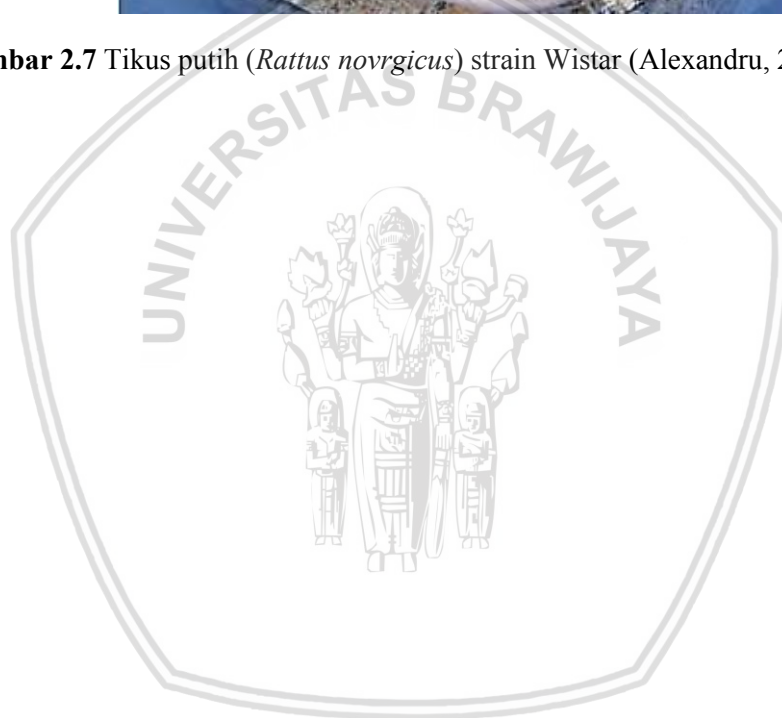
Kerajaan : *Animalia*
Divisi : *Chordata*
Kelas : *Mammalia*
Ordo : *Rodentia*
Subordo : *Myomorpha*
Famili : *Muridae*
Genus : *Rattus*
Spesies : *Rattus novergicus*

Tikus putih strain Wistar memiliki karakteristik yaitu kepala lebar, telinga memanjang dan ukuran ekor yang lebih pendek dibandingkan dengan panjang badan tikus. Tikus Wistar termasuk ke dalam tikus albino yang masuk dalam spesies *Rattus norvegicus*, yang pertama kali dikembangkan oleh institut Wistar pada tahun 1906 untuk kepentingan penelitian biologi dan kesehatan (Alexandru, 2011). Tikus putih (*Rattus novergicus*) strain Wistar dapat dilihat pada **Gambar 2.6**.

Kadar glukosa darah normal pada tikus berkisar antara 50-135 mg/dl, tikus dikatakan mengalami diabetes apabila kadar glukosa darahnya >200 mg/dl (Carvalho *et al.*, 2003).

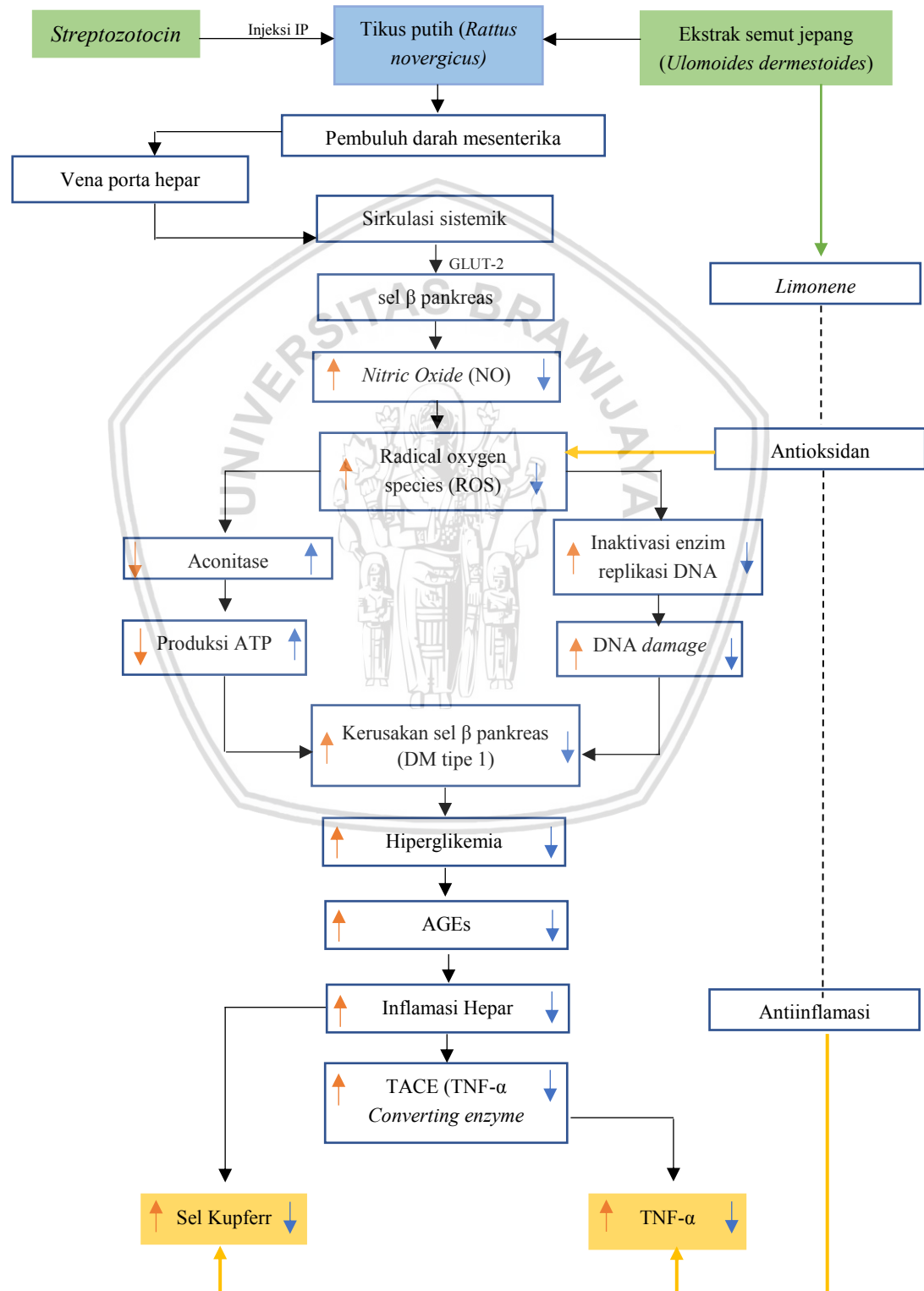


Gambar 2.7 Tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar (Alexandru, 2011)



BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESA PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Keterangan :

- : Variabel bebas
- : Variabel kendali
- : Variabel tergantung
- : Efek pemberian *streptozotocin*
- : Efek pemberian semut jepang (*Ulomoides dermestoides*)
- : Kandungan senyawa aktif *Limonene*
- : Senyawa aktif semut jepang (*Ulomoides dermestoides*)
- : Target kerja

Gambar 3.1 Kerangka konseptual

Diabetes melitus (DM) merupakan penyakit kelainan metabolik yang ditandai dengan terjadinya peningkatan glukosa darah (hiperglikemia) dan kelainan pada metabolisme karbohidrat, protein dan lemak. Penyakit DM tipe 1 ditandai dengan terganggunya proses produksi hormon insulin yang dihasilkan oleh sel β pankreas (WHO, 1999). *Streptozotocin* merupakan radikal bebas bagi tubuh karena dapat menyebabkan kerusakan pada sel β pankreas (Goud *et al.*, 2015). Oleh sebab itu, *streptozotocin* banyak dimanfaatkan untuk induksi hewan model DM tipe 1 (Nugroho, 2006).

Streptozotocin merupakan senyawa toksik yang selektif merusak sel β pankreas karena memiliki bagian *2-deoxy glucose* yang analog dengan struktur glukosa yang akan memasuki sel melalui perantara GLUT-2 yang terdapat pada sel β pankreas. *Streptozotocin* yang diinjeksikan secara IP akan masuk ke pembuluh darah mesenterika menuju vena porta untuk melalui proses metabolisme hepatic dan kemudian didistribusikan ke seluruh tubuh secara sistemik (Turner *et al.*, 2011). *Streptozotocin* yang masuk ke dalam sel β pankreas melalui GLUT-2 akan mengalami proses fosforilasi oksidatif dan

menghasilkan *Nitric oxide* (NO) yang merupakan *reactive nitrogen species* (RNS), di dalam mitokondria NO dapat menurunkan aktivitas enzim *cythochrom c oxidase* sehingga produksi *reactive oxygen species* (ROS) meningkat, yang dapat menurunkan aktifitas enzim aconitase. Turunnya enzim aconitase mengakibatkan turunnya aktivitas siklus kreb. Produksi ATP mitokondria akan mengalami penurunan sehingga terjadi kematian pada sel β pankreas. ROS dapat mempengaruhi aktivitas replikasi DNA dengan cara menginaktivasi enzim yang berperan dalam replikasi DNA, yaitu enzim ribonukleotida reduktase yang berfungsi untuk mengkatalisis pembentukan *deoxyribonucleotides* dari *ribonucleotides*, turunnya aktivitas dari enzim ribonukleotida reduktase berakibat pada turunnya aktivitas replikasi DNA yang menyebabkan kerusakan DNA sel sehingga terjadi kematian pada sel β pankreas.

Kerusakan sel β pankreas berakibat pada turunnya produksi hormon insulin yang berfungsi untuk mengontrol kadar glukosa dalam darah. Semakin rendah produksi hormon insulin maka akan semakin tinggi kadar glukosa dalam darah. Peningkatan glukosa darah akan mengakibatkan terjadinya oksidasi antara glukosa dengan protein plasma yang menghasilkan radikal bebas berupa *advance glycation end products* (AGEs). Radikal bebas pada hepar akan memicu peningkatan sel Kupffer yang berfungsi sebagai makrofag jaringan pada hepar dan peningkatan sitokin pro-inflamasi, TNF- α . AGEs yang bersifat glikotoksin menyebabkan terjadinya inflamasi pada hepar, yang dapat memicu peningkatan pada jumlah sel Kupffer yang berfungsi sebagai

makrofag jaringan pada hepar. Inflamasi yang terjadi pada hepar akan mengaktivasi TNF- α *converting enzyme* yang berfungsi untuk mengkatalisis prekursor TNF- α menjadi TNF- α , sehingga terjadi peningkatan produksi TNF α (Yang *et al.*, 2016).

Semut jepang (*Uromoides dermestoides*) merupakan hama yang banyak ditemukan pada bahan biji-bijian seperti kacang, jagung, sorgum, beras dan kedelai. *U. dermestoides* banyak di konsumsi oleh masyarakat secara langsung untuk pengobatan alternatif, salah satunya adalah penyakit diabetes melitus. *Uromoides dermestoides* yang di ekstraksi dengan menggunakan pelarut etanol akan menghasilkan beberapa senyawa kimia aktif, diantaranya adalah senyawa *alpha-pinene*, *alpha-terpinene*, *beta-phellandrene*, *methyl mystritate*, *methyl palmitate*, *methyl linoleate*, *methyl oleate*, *methyl stearate*, *pentadecanol* dan *limonene*. *Limonene* merupakan senyawa yang bersifat antiinflamasi dan antioksidan. Kandungan senyawa *limonene* dalam satu ekor semut mencapai 17.15%. Kerja senyawa *limonene* dalam tubuh adalah dengan cara menurunkan produksi *reactive oxygen species* (ROS) dan menurunkan ekspresi sitokin pro-inflamasi, salah satunya adalah TNF- α .

Sebagai antioksidan, *limonene* yang terkandung di dalam *U. dermestoides* mampu menghambat kerusakan pada sel hepar yang diakibatkan oleh penyakit DM tipe 1 pada hewan coba tikus putih Wistar (*Rattus novergus*) yang diinduksi dengan menggunakan *streptozotocin* secara *multi low dose-streptozotocin* yang ditandai dengan terjadinya penurunan pada sel Kupffer hepar. *Limonene* sebagai antiinflamasi mampu menurunkan ekspresi dari sitokin

pro-inflmasi, TNF- α . Dalam penelitian ini , kandungan *limonene* yang terdapat dalam *U. dermestoides* diharapkan mampu menurunkan kadar radikal bebas pada hewan coba DM tipe 1, sehingga terjadi penurunan pada jumlah sel Kupffer dan ekpresi sitokin pro-inflamasi TNF- α .

3.2 Hipotesa Penelitian

Hipotesa penelitian berdasarkan rumusan masalah yaitu:

1. Pemberian ekstrak semut jepang (*Uromoides dermestoides*) dapat menurunkan jumlah sel Kupffer pada tikus Wistar (*Rattus novergicus*) model DM tipe 1 yang diinduksi oleh *streptozotocin*.
2. Pemberian ekstrak semut jepang (*Uromoides dermestoides*) dapat menurunkan ekspresi TNF- α hepar pada tikus Wistar (*Rattus novergicus*) model DM tipe 1 yang diinduksi oleh *streptozotocin*.

BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari-Maret 2018 di Laboratorium Ekologi dan Diversitas Hewan Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya untuk determinasi semut jepang (*Ulomoides dermestoides*), Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya untuk pemeliharaan dan perlakuan terhadap hewan coba, Laboratorium Materia Medika Batu untuk pembuatan ekstrak Semut Jepang (*Ulomoides dermestoides*), Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya untuk pembuatan preparat histopatologi dan imunohistokimia hepar.

4.2 Alat dan Bahan

Pada tahap pertama penelitian yaitu persiapan hewan coba, beberapa alat-alat yang diperlukan adalah ruangan untuk menempatkan kandang, kandang pemeliharaan, tempat pakan, tempat minum. Bahan yang diperlukan adalah tikus putih berjenis kelamin jantan (*Rattus novergus*) galur Wistar dengan berat badan ± 200 gram sebanyak 20 ekor, pakan dan minum hewan percobaan dan sekam.

Pada tahap kedua penelitian yaitu pembuatan hewan coba Diabetes mellitus tipe 1, alat-alat yang diperlukan adalah *disposable syringe* ukuran 1 mL untuk injeksi secara *intraperitoneal*, dan *glucometer* untuk mengukur

kadar glukosa darah hewan coba setelah diberi perlakuan, bahan yang diperlukan adalah *streptozotocin* yang berfungsi sebagai diabetogenik (dosis penggunaan 20 mg/kg BB) dan *buffer citrate* dengan pH 4.6 untuk melarutkan *streptozotocin*.

Pada tahap ketiga penelitian yaitu pembuatan, perhitungan dosis dan pemberian ekstrak semut jepang (*Ulomoides dermestoides*) alat-alat yang dibutuhkan adalah *alcoholmeter*, *beaker glass*, *erlenmeyer*, *oven*, *shaker* digital, botol, corong gelas, gelas ukur, kertas saring, penangas air, timbangan analitik, dan sonde lambung. Bahan yang dibutuhkan yaitu semut jepang (*Ulomoides dermestoides*), *aquades* dan ethanol.

Pada tahap keempat penelitian yaitu isolasi organ hepar alat-alat yang dibutuhkan yaitu *scalpel*, *blade*, pinset, gunting dan pot organ. Bahan-bahan yang dibutuhkan yaitu formalin 10% dan PBS.

Pada tahap kelima penelitian yaitu pembuatan preparat histopatologi organ hepar dengan menggunakan pewarnaan *hematoxylin* dan *eosin* alat-alat yang dibutuhkan adalah *object glass*, *cover slip*, alat pemotong jaringan, wadah pewarnaan, penjepit mikrotom, inkubator dan mikroskop Olympus BX51. Bahan-bahan yang dibutuhkan adalah etanol absolut, etanol 95%, etanol 90%, etanol 80%, etanol 70%, alkohol absolut, alkohol 95%, alkohol 90%, alkohol 80%, alkohol 70%, xylol II, xylol I, formaldehid, *ettelan*, *aquades*, parafin dan pewarna *hematoxylin* dan *eosin*.

Pada tahap keenam penelitian yaitu pembuatan preparat histopatologi hepar dengan pewarnaan imunohistokimia dan perhitungan ekspresi TNF-*alfa*

hepar alat-alat yang dibutuhkan adalah *object glass*, *cover slip*, sentrifugator, mikropipet, *yellow tip*, *refrigerator* dan mikroskop Olympus BX51. Bahan-bahan yang dibutuhkan adalah *aquades* steril, PBS pH 7.4, alkohol 100%, 95%, 90%, 80% dan 70%, xylol I, II dan III, *Hematoxylin Eosin*, *ettelen*, H_2O_2 , *rat Anti TNF- α* , *anti rat IgG biotin labeled* dan *3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride*.

4.3 Tahapan Penelitian

1. Rancangan penelitian dan persiapan hewan coba
2. Pembuatan hewan coba diabetes mellitus tipe 1
3. Pembuatan dan perhitungan dosis ekstrak semut jepang (*Ulomoides dermestoides*)
4. Pemeriksaan kadar gula darah hewan coba diabetes mellitus tipe 1
5. Pemberian ekstrak semut jepang (*Ulomoides dermestoides*) pada hewan coba diabetes mellitus tipe 1
6. Pengambilan sampel organ hepar
7. Pembuatan preparat histopatologi hepar dengan menggunakan pewarnaan *Hematoxylin Eosin*
8. Pembuatan preparat histopatologi hepar dengan menggunakan pewarnaan imunohistokimia
9. Perhitungan ekspresi imunohistokimia TNF- α
10. Perhitungan jumlah sel Kupffer hepar

4.4 Prosedur Kerja

4.4.1 Rancangan Penelitian dan Persiapan Hewan Coba

Penelitian yang dilakukan merupakan penelitian yang bersifat eksperimental dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hewan coba yang digunakan dikelompokkan menjadi 5 kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, kelompok perlakuan 1 dosis ekstrak semut jepang (*Ulomoides dermestoides*), kelompok perlakuan 2 dosis ekstrak semut jepang (*Ulomoides dermestoides*), kelompok perlakuan 3 dosis ekstrak semut jepang (*Ulomoides dermestoides*). Desain kelompok penelitian dapat dilihat pada tabel 4.1.

Tabel 4.1. Desain kelompok penelitian

Kelompok	Keterangan
K1	Kontrol Negatif
K2	Kontrol Positif
P1	Hewan coba DM I diberikan ekstrak semut jepang (<i>Ulomoides dermestoides</i>) dosis 2,3 mg/kg BB selama 14 hari
P2	Hewan coba DM I diberikan ekstrak semut jepang (<i>Ulomoides dermestoides</i>) dosis 4,6 mg/kg BB selama 14 hari
P3	Hewan coba DM I diberikan ekstrak semut jepang (<i>Ulomoides dermestoides</i>) dosis 9,2 mg/kg BB selama 14 hari

Hewan coba yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar dengan berat badan ± 200 gram berjenis kelamin jantan, yang diaklimatisasi selama 7 hari untuk dapat menyesuaikan dengan kondisi laboratorium. Perhitungan jumlah hewan coba yang

digunakan untuk 5 kelompok penelitian dihitung berdasarkan rumus (Supranto, 2000):

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

$$4(r-1) \geq 15$$

$$4r-4 \geq 15$$

$$4r \geq 19$$

$$r \geq 4.75$$

Keterangan:

t : *treatment*

r : *replicate*

Jumlah pengulangan yang diperlukan dalam 1 kelompok hewan percobaan adalah paling sedikit 5 ekor hewan, sehingga jumlah tikus yang diperlukan dalam penelitian ini adalah 25 ekor tikus. Variabel yang diamati dalam penelitian ini diantaranya adalah:

Variabel kendali	Tikus putih (<i>Rattus novergicus</i>), galur, umur, jenis kelamin, berat badan, pakan, air minum dan kandang
Variabel bebas	Dosis <i>streptozotocin</i> dan dosis ekstrak semut jepang (<i>Ulomoides dermestoides</i>)
Variabel tergantung	Jumlah sel Kupffer dan ekspresi TNF- α

4.4.2 Pembuatan Hewan Coba Diabetes Mellitus 1

Pembuatan hewan coba DM tipe 1 dilakukan pada 4 kelompok uji yaitu kelompok K2, P1, P2 dan P3 dengan cara menginjeksikan *streptozotocin* yang berfungsi sebagai agen *diabetogenic* secara *intraperitoneal* dengan dosis 20 mg/kgBB. Kadar glukosa dari masing-masing hewan coba diukur gula darahnya setelah masa adaptasi dan setelah dilakukan injeksi *streptozotocin*. Glukosa darah normal pada tikus adalah 50-135 mg/dl. Injeksi *streptozotocin* dilakukan selama 5 hari berturut-turut dengan masa inkubasi selama 9 hari. Injeksi *streptozotocin*

dilakukan pada hari ke-9 penelitian hingga hari ke-13 penelitian, dan masa inkubasi *streptozotocin* dimulai pada hari ke-14 penelitian hingga hari ke-22 penelitian. Perhitungan kadar glukosa darah dilakukan pada 7 hari pasca induksi dan 9 hari pasca induksi (hari ke-20 dan hari ke-22). Pada tikus model DM tipe 1 terjadi peningkatan kadar glukosa darah dikarenakan rusaknya sel β pankreas sehingga produksi insulin mengalami penurunan, peningkatan kadar glukosa darah pada tikus yang mengalami DM mencapai >200 mg/dl (Carvalho *et al.*, 2003).

1.4.3 Pembuatan dan Perhitungan Dosis Ekstrak Semut Jepang (*Ulomoides dermestoides*)

Metode maserasi digunakan untuk membuat ekstrak semut jepang (*Ulomoides dermestoides*). Metode maserasi merupakan suatu proses pemisahan zat pada suatu komponen dengan penyaringan sederhana menggunakan pelarut tertentu, cairan penyaring akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif selanjutnya zat aktif akan terlarut karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dengan yang di luar sel (Rais, 2014). Pembuatan ekstrak dimulai dengan menimbang semut jepang (*Ulomoides dermestoides*) sebanyak 6 gram. Dihaluskan menggunakan *mortar* dengan ditambahkan pelarut etanol 70%. Bahan yang telah dihaluskan dimasukkan ke dalam toples, diratakan dan ditambahkan pelarut etanol 70% sampai terendam (pelarut yang digunakan minimal 2 kali berat bahan). Tutup toples dengan rapat selama 72 jam. Diaduk diatas *shaker* digital dengan kecepatan 50rpm. Ekstrak cair disaring

dengan kertas saring dan ditampung dalam erlenmeyer. Hasil ekstrak cair kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator* selama kurang lebih 1 jam 30 menit. Ekstrak yang dihasilkan diuapkan kembali di atas penangas air selama 2 jam. Dari 6 gram semut jepang (*Ulomoides dermestoides*) yang diekstraksi menggunakan pelarut etanol 70% sebanyak 100 mL dihasilkan ekstrak seberat 3.2 gram.

Penentuan dosis ekstrak semut jepang menurut Sari (2017) dengan cara mengkonversikan dosis pada manusia ke tikus, dosis lazim semut jepang pada manusia dengan berat 50 kg adalah 3 ekor (0,0181 gram). Besar faktor konversi dari manusia 70 kg ke tikus 200 gram adalah 0,181, maka perhitungan dosis untuk tikus 200 gram adalah sebagai berikut:

$$\begin{aligned}\text{Dosis} &= (70 \text{ kg}/50 \text{ kg}) \times 0,0181 \text{ gram} \times 0,0181 \\ &= 0,00046 \text{ gram}/200 \text{ gram} \\ &= 0,0023 \text{ g/Kg BB} \\ &= 2,3 \text{ mg/Kg BB}\end{aligned}$$

Pada penelitian ini dosis yang digunakan 3 kelompok terapi yaitu 2.3 mg/KgBB, 4.6 mg/KgBB dan 9.2 mg/KgBB.

4.4.4 Pemeriksaan Kadar Glukosa Darah

Pemeriksaan kadar glukosa darah dilakukan sebanyak 3 kali. Pemeriksaan pertama dilakukan pada saat hewan coba telah melewati masa aklimatisasi, pemeriksaan kedua dilakukan hari ke-7 pasca injeksi *streptozotocin* dan pemeriksaan ketiga dilakukan pada hari ke-9 pasca

injeksi *streptozotocin*. Pemeriksaan dilakukan dengan menggunakan strip *glucometer* dan *glucometer Easy Touch*. Darah yang diperiksa diperoleh dari pembuluh darah yang berada diujung ekor tikus. Ekor tikus diurut dari bagian pangkal hingga mendekati ujung, ujung ekor di bersihkan dengan menggunakan alkohol 70%, kemudian ditusuk dengan menggunakan *lancet*. Darah yang keluar disentuhkan pada strip *glucometer* yang telah terpasang pada *glucometer Easy Touch*. Kadar glukosa darah pada tikus yang diuji akan tampak pada layar dalam satuan mg/dl. Kadar glukosa darah normal pada tikus berkisar antara 50-135 mg/dl, tikus dikatakan mengalami DM apabila kadar glukosa darahnya >200 mg/dl (Carvalho *et al.*, 2003).

4.4.5 Pemberian Ekstrak Semut Jepang (*Ulomoides dermestoides*)

Pemberian ekstrak semut jepang (*Ulomoides dermestoides*) pada hewan coba DM tipe 1 dilakukan dengan sonde lambung selama 14 hari sesuai dosis yang telah ditentukan.

4.4.6 Isolasi Organ Hepar

Isolasi organ hepar dilakukan dengan cara eutanasi tikus dengan menggunakan teknik dislokasi leher. Pembedahan dilakukan untuk mengisolasi organ hepar. Organ hepar direndam dalam larutan PBS untuk membersihkan dari kotoran dan disimpan dalam larutan formalin konsentrasi 10%.

4.4.7 Pembuatan Preparat Histologi Hepar dengan Pewarnaan HE

Menurut Yusuf (2009) tahapan pembuatan preparat hitologi meliputi 9 tahapan yaitu fiksasi (*fixation*), dehidrasi (*dehydration*), *clearing*, *embedding*, *bloking*, pemotongan jaringan (*sectioning*), pewarnaan (*staining*), *mounting* dan pelabelan (*labelling*).

1. Fiksasi

Fiksasi bertujuan untuk mempertahankan susunan jaringan serta pengerasan jaringan agar pada saat pengirisan tipis pada jaringan-jaringan yang lunak didapatkan hasil yang baik. Organ yang difiksasi harus diiris dengan ketebalan 3-5 mm sehingga larutan fiksasi dapat merata keseluruh jaringan. Larutan yang paling sering digunakan untuk larutan fiksasi adalah formalin 10%.

2. Dehidrasi

Dehidrasi merupakan tahapan mengeluarkan cairan yang ada dalam jaringan dengan tujuan jaringan dapat diisi dengan menggunakan parafin. Hal, ini dikarenakan air yang terdapat dalam jaringan tidak dapat bercampur dengan parafin. Dehidrasi dilakukan dengan cara merendam jaringan ke dalam larutan etanol secara bertingkat. Etanol yang digunakan dengan konsentrasi 70% (24 jam), 80% (2 jam), 90%, 95% dan etanol absolut (20 menit). Proses ini dilakukan pada suhu 4°C.

3. *Clearing*

Clearing merupakan tahapan mengeluarkan alkohol dari proses dehidrasi yang telah dilakukan. Alkohol yang terdapat dalam jaringan harus dikeluarkan sepenuhnya agar parafin dapat mengisi jaringan. Jaringan harus terisi dengan parafin secara sempurna untuk memudahkan pemotongan jaringan dengan menggunakan mikrotom.

4. *Embedding*

Embedding adalah tahapan mengeluarkan cairan *clearing* pada tahapan sebelumnya dari dalam cairan untuk digantikan dengan parafin. Sisa-sisa cairan *clearing* yang tertinggal pada jaringan akan mengkristal dan menyebabkan jaringan mudah robek pada saat tahapan pemotongan. *Embedding* dilakukan dengan menggunakan larutan xylol I (20 menit) dan xylol II (30 menit).

5. *Blocking*

Blocking merupakan proses blok preparat dengan menggunakan parafin cair. Tujuan dari proses ini adalah agar prepat mudah dipotong dengan menggunakan mikrotom.

6. Pemotongan (*Sectioning*) dan *Mounting*

Pemotongan adalah proses memotong jaringan organ yang telah di blok dengan menggunakan parafin dengan menggunakan mikrotom. Ketebalan pemotongan jaringan berkisar antara 5-7 mikrometer. Perekatan jaringan pada *objek glass* dilakukan di

waterbath. Jaringan disimpan dalam inkubator dengan suhu 38-40°C selama 24 jam sebelum dilakukan pewarnaan dengan pewarna HE.

7. Pewarnaan (*Staining*)

Pewarnaan adalah proses pemberian warna pada jaringan yang telah dipotong sehingga unsur jaringan menjadi kontras. Pewarnaan yang biasa dipakai untuk pewarnaan jaringan adalah *Hematoxylin eosin*. Pewarna HE mengandung 2 zat warna yaitu *hematoxylin* yang berfungsi untuk mewarnai inti sel menjadi warna biru dan *eosin* yang berfungsi untuk mewarnai sitoplasma sel menjadi warna merah muda.

4.4.8 Pembuatan Preparat Histologi Hepar dengan Pewarnaan Imunohistokimia

Tahapan awal dalam pembuatan preparat imunohistokimia adalah deparafinisasi dengan menggunakan larutan xylol I, II dan III untuk menghilangkan parafin yang ada dalam jaringan untuk mempermudah masuknya zat warna. Preparat didehidrasi dengan menggunakan alkohol secara bertingkat dengan konsentrasi 100%, 95%, 90%, 80% dan 70 % dan akuades steril, pada masing-masing larutan tersebut preparat direndam selama 2 menit. Preparat dicuci dengan menggunakan PBS pH 7.4 (sebanyak 3 kali, masing-masing selama 5 menit) lalu direndam dalam hidrogen peroksida 3% (dalam PBS) selama 10 menit dan dilakukan pencucian kembali dengan menggunakan PBS pH 7.4 (sebanyak 3 kali, masing-masing selama 5 menit) dan dilakukan perendaman dalam BSA 1% (dalam PBS) selama 1 jam pada suhu ruang.

Preparat ditetesi dengan menggunakan antibodi primer *rat Anti TNF- α* dalam BSA 1 % (dalam PBS) dengan perbandingan 1:100 dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 4°C. Preparat dikeluarkan dari *refrigerator* dan diinkubasi dalam suhu ruang selama 30 menit dan dilakukan pencucian dengan menggunakan PBS pH 4.7 (sebanyak 3 kali, masing-masing selama 5 menit). Preparat ditetesi antibodi sekunder, dengan menggunakan *Rabbit Anti rat IgG biotin labeled* yang diencerkan dengan menggunakan PBS (1:200) dan diinkubasi pada suhu ruang selama 1 jam. Preparat dicuci dengan menggunakan PBS pH 4.7 (sebanyak 3 kali, masing-masing selama 5 menit). Ditambahkan kromogen DAB (3,3-*diaminobenzidine tetrahydrochloride*) diinkubasi pada suhu ruang selama 20 menit, pencucian dilakukan dengan menggunakan PBS pH 4.7 (sebanyak 3 kali, masing-masing selama 5 menit). Pewarnaan dengan menggunakan HE dilakukan selama 5 menit dan dilakukan perekatan dengan menggunakan *ettele*n.

4.4.9 Perhitungan Jumlah Sel Kupffer Hepar

Preparat histologi hepar yang telah diwarnai dengan menggunakan pewarnaan HE diamati dengan menggunakan mikroskop *Olympus BX51* dengan menggunakan perbesaran 400X pada 5 lapang pandang. Perhitungan jumlah sel Kupffer dianalisa dengan menggunakan *software Image Raster*.

4.4.10 Perhitungan Ekspresi Imunohistokimia TNF- α Hepar

Preparat histologi hepar yang telah diwarnai dengan menggunakan pewarnaan imunohistokimia diamati dengan menggunakan mikroskop *Olympus* BX51 dengan menggunakan perbesaran 400X pada 5 lapang pandang. Perhitungan ekspresi TNF- α dianalisa dengan menggunakan aplikasi *Immuno Ratio*. Hasil uji positif pewarnaan imunohistokimia ditunjukkan dengan ekspresi TNF- α yang berwarna kecoklatan yang dinyatakan dalam persentase.

4.5 Analisa Data

Data yang diperoleh dari perhitungan ekspresi TNF- α dan jumlah sel Kupffer merupakan data kuantitatif yang dianalisa dengan menggunakan uji ragam ANOVA dan dilanjutkan dengan uji *Tukey* atau BNJ (Beda Nyata Jujur) $\alpha=0,05$, menggunakan *software* SPSS 24.

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Perhitungan Kadar Glukosa Hewan Coba

Penyakit Diabetes Mellitus tipe 1 merupakan penyakit kelainan metabolik yang terjadi akibat adanya defisiensi insulin (WHO, 1999). Insulin merupakan hormon yang berfungsi dalam regulasi glukosa darah dengan cara meningkatkan proses glikogenesis dan glikolisis. (Ünal *et al.*, 2012). Defisiensi hormon insulin berakibat pada kenaikan kadar glukosa dalam darah (hiperglikemia). Kadar glukosa darah pada tikus berkisar antara 50-135 mg/dl dan tikus dikatakan mengalami diabetes apabila kadar glukosa darah >200 mg/dl, dalam rentang antara 136-200 mg/dl dikatakan tikus mengalami kondisi hiperglikemia (Carvalho *et al.*, 2003).

Hiperglikemia merupakan suatu kondisi dimana terjadi peningkatan kadar glukosa diatas rata-rata kadar glukosa darah normal, hiperglikemia identik dengan penyakit diabetes mellitus, akan tetapi tidak semua kondisi hiperglikemia disebabkan oleh penyakit diabetes mellitus. Beberapa penyebab terjadinya hiperglikemia diantaranya adalah kondisi stress dan peningkatan metabolisme glukosa (Goyal *et al.*, 2014). Pada penderita diabetes mellitus terjadi peningkatan kadar glukosa yang tinggi diatas kadar glukosa darah normal yang diakibatkan oleh menurunnya kemampuan tubuh untuk menggunakan dan menyimpan glukosa yang disebabkan oleh defisiensi hormon insulin (Carvalho *et al.*, 2003).

Dalam penelitian yang dilakukan oleh penulis, perhitungan kadar glukosa darah dilakukan untuk menentukan apakah glukosa darah menunjukkan diabetes, hiperglikemia atau dalam keadaan normal. Perhitungan kadar glukosa darah dilakukan sebanyak 3 kali yaitu sebelum induksi *streptozotocin*, setelah induksi *streptozotocin* selama 5 hari dan masa inkubasi 9 hari dan setelah diberikan ekstrak semut jepang (*Ulomoides dermestoides*) selama 14 hari. Rata-rata kadar glukosa darah pada hewan coba dapat dilihat pada **Tabel 5.1**.

Tabel 5.1 Rata-rata Kadar Glukosa Darah, Jumlah Sel Kupffer dan Ekspresi TNF- α Pada Hewan Coba

Parameter	Kelompok Perlakuan					Sig
	K1	K2	P1	P2	P3	
Kadar glukosa sebelum perlakuan	100,4	121,6	117,4	123,2	122,2	-
SEM	9,38	4,64	6,03	8,26	8,51	
Kadar glukosa setelah induksi <i>streptozotocin</i> selama 5 hari	107,2	234,2	218,8	231,4	213	**
SEM	6,56	7,17	4,69	7,13	3,61	
Kadar glukosa setelah pemberian ekstrak semut jepang selama 14 hari	109	226,6	161	242	262,6	**
SEM	6,83	9,03	17,75	13,82	23,96	
Jumlah sel Kupffer setelah pemberian ekstrak semut jepang selama 14 hari	42,8	73,8	48,3	52,6	60,5	**
SEM	2,29	2,07	2,32	1,15	1,26	
Ekspresi TNF- α setelah pemberian ekstrak semut jepang selama 14 hari	0,29	0,62	0,32	0,55	0,55	**
SEM	0,004	0,017	0,014	0,031	0,021	

Keterangan :

- : Rata-rata kadar glukosa darah normal
- : Rata-rata kadar glukosa darah diabetes
- : Rata-rata kadar glukosa darah hiperglikemia
- : Tidak signifikan

- * : Signifikan ($p < 0,05$)
** : Sangat Signifikan ($p < 0,01$)

Dari **Tabel 5.1** dapat dilihat bahwa rata-rata kadar glukosa darah tikus pada semua kelompok perlakuan sebelum dilakukan induksi dengan menggunakan *streptozotocin* dalam kondisi normal, yaitu diantara 50-135 mg/dl. Rata-rata kadar glukosa darah setelah diinduksi *streptozotocin* selama 5 hari dengan dosis 20 mg/kgBB dengan masa inkubasi selama 9 hari pada kelompok perlakuan K2 (234,2), P1 (218,8), P2 (231,4) dan P3 (213) menunjukkan terjadinya peningkatan kadar glukosa darah mencapai >200 mg, hal ini mengindikasikan bahwa tikus pada kelompok tersebut mengalami diabetes yang disebabkan oleh kerusakan pada sel β pankreas akibat dari induksi *streptozotocin*, sehingga terjadi defisiensi hormon insulin. *Streptozotocin* merupakan senyawa *nitrosurea* potensial sebagai donor NO yang dapat menyebabkan kerusakan pada sel dengan cara merusak DNA sel dan menurunkan produksi ATP. *Nitric Oxide* akan mereduksi dan mengoksidasi bagian *binuclear* dari enzim *cythochrom c oxidase* yang menyebabkan enzim terinaktivasi yang menyebabkan peningkatan produksi ROS (O_2^- dan H_2O_2) (Sarti *et al.*, 2000; Srinivasan *et al.*, 2012; Schull *et al.*, 2015). ROS menyebabkan kerusakan pada enzim aconitase dengan cara merusak gugus Fe-S pada enzim (Cantu *et al.*, 2009). Turunnya jumlah enzim aconitase berakibat pada turunnya produksi ATP yang mengakibatkan kerusakan pada sel (Goud *et al.*, 2015). ROS juga dapat menyebabkan kerusakan pada sel dengan cara menginaktivasi enzim ribonukleotida reduktase yang berfungsi untuk menyuplai prekursor *deoxyribonucleotida* yang berfungsi untuk sintesis dan *repair* DNA sel, inaktivasi enzim ini akan menyebabkan kematian pada sel β pankreas (Shao *et al.*, 2005).

Hewan coba pada kelompok perlakuan P1, P2 dan P3 yang telah mengalami diabetes mellitus tipe 1 diterapi dengan menggunakan ekstrak semut jepang (*Ulomoides dermestoides*) selama 14 hari dengan menggunakan dosis 2,3 mg/KgBB, 4,6 mg/KgBB dan 9,2 mg/KgBB dengan menggunakan sonde lambung. Sedangkan pada hewan coba kelompok perlakuan K2 yang telah mengalami kondisi diabetes mellitus tipe 1 tidak diberi terapi ekstrak semut jepang (*Ulomoides dermestoides*).

Dari hasil perhitungan rata-rata kadar glukosa darah setelah dilakukan terapi ekstrak semut jepang (*Ulomoides dermestoides*) selama 14 hari pada kelompok P1, P2 dan P3, didapatkan data bahwa hanya kelompok P1 yang mengalami penurunan rata-rata kadar glukosa darah <200 mg/dl. Rata-rata kadar glukosa darah pada kelompok perlakuan P1 menunjukkan 161, rata-rata kadar glukosa darah tersebut masih menunjukkan diatas kadar glukosa darah normal pada tikus yaitu 50-135 mg/dl, sehingga dapat dikatakan bahwa hewan coba pada kelompok perlakuan P1 masih mengalami hiperglikemia akan tetapi tidak mengalami kondisi diabetes mellitus. Pada kelompok perlakuan K2 (226,6), P2 (242) dan P3 (262,6) masih mengalami kondisi diabetes mellitus tipe 1, karena rata-rata kadar glukosa darah >200 mg/dl, sedangkan pada kelompok perlakuan K1 rata-rata kadar glukosa darah masih dalam keadaan normal dengan rata-rata kadar glukosa darah 109.

Penurunan kadar glukosa darah pada kelompok perlakuan yang diinduksi dengan menggunakan *streptozotocin* dan diterapi dengan menggunakan ekstrak semut jepang (*Ulomoides dermestoides*) hanya terjadi pada kelompok perlakuan P1. Kadar glukosa darah menurun dari kondisi diabetes mellitus menjadi kondisi

hiperglikemia dan normal **Lampiran 16**. Hal ini dikarenakan senyawa aktif pada ekstrak semut jepang (*Ulomoides dermestoides*) berfungsi untuk menetralkan ROS yang terbentuk akibat induksi *streptozotocin*, sehingga dapat menghambat kerusakan sel β pankreas.

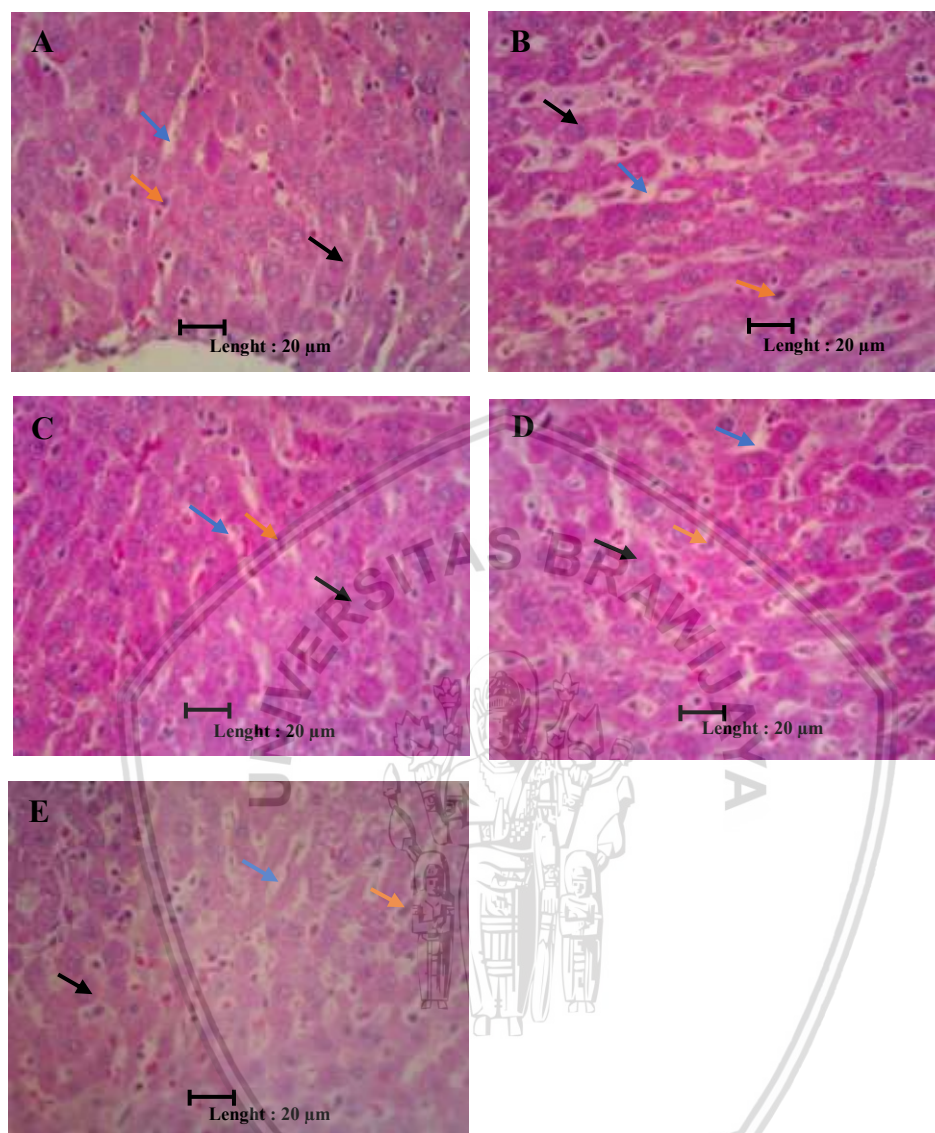
Pada kelompok perlakuan P2 dan P3 tidak terjadi penurunan kadar glukosa darah, hal ini dikarenakan senyawa *limonene* dalam jumlah yang tinggi dapat meningkatkan pembentukan senyawa hidrogen peroksida (H_2O_2) yang bersifat merusak DNA sel dan dapat menyebabkan percepatan kerusakan pada sel β pankreas. Percepatan kerusakan sel β pankreas akibat pemberian *limonene* dalam jumlah yang tinggi, akan meningkatkan kadar glukosa darah pada kelompok perlakuan P2 dan P3 (Dhawan, 2014).

Dari data perhitungan rata-rata kadar glukosa diatas dibandingkan dengan data rata-rata jumlah sel Kupffer dan ekspresi $TNF-\alpha$, ditunjukkan dengan rata-rata jumlah sel Kupffer dan ekspresi $TNF-\alpha$ pada kelompok perlakuan P1 dan K1 dengan rata-rata kadar glukosa <200 mg/dl memiliki jumlah yang lebih kecil dibandingkan dengan rata-rata jumlah sel Kupffer dan ekspresi $TNF-\alpha$ pada kelompok perlakuan K2, P2 dan P3 yang memiliki rata-rata kadar glukosa darah >200 mg/dl. Sedangkan, rata-rata jumlah sel Kupffer dan ekspresi $TNF-\alpha$ pada kelompok perlakuan K1 dengan rata-rata kadar glukosa darah <135 mg/dl memiliki jumlah yang lebih kecil dibandingkan dengan rata-rata jumlah sel Kupffer dan ekspresi $TNF-\alpha$ pada kelompok perlakuan P1 yang memiliki rata-rata kadar glukosa darah >135 mg/dl.

5.2 Pengaruh Pemberian Ekstrak Semut Jepang (*Ulomoides dermestoides*) Terhadap Jumlah Sel Kupffer

Hasil penelitian pengaruh pemberian ekstrak semut jepang (*Ulomoides dermestides*) terhadap jumlah sel Kupffer hepar pada tikus Wistar (*Rattus novergicus*) yang diinduksi *streptozotocin* dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya *Olympus BX51* perbesaran 400X. Perhitungan sel Kupffer dilakukan sebanyak 5 lapang pandang pada masing-masing perlakuan dengan menggunakan *software Image Raster*. Rataan perhitungan dari masing-masing kelompok perlakuan dianalisa dengan *software SPSS* menggunakan uji *One Way ANOVA* dilanjutkan uji *Tukey* atau *BNJ* ($\alpha=0,05$).

Sel Kupffer merupakan makrofag jaringan yang terdapat pada Hepar yang berfungsi sebagai sistem imun dengan cara memfagosit benda asing, toksik dan agen inflamasi yang banyak terdapat pada darah yang masuk ke dalam hepar melalui vena portalis. Sel Kupffer terdapat pada permukaan luminal atau di dalam endotelial sinusoid dan dapat mengalami peningkatan pada saat terjadi stress oksidatif maupun adanya inflamasi jaringan (Dixon *et al.*, 2013). Gambaran histopatologi hepar dengan pewarnaan HE dapat dilihat pada **Gambar 5.1**.



Gambar 5.1 Histopatologi Hepar Tikus (*Rattus norvegicus*) Pewarnaan HE Perbesaran 400x

Keterangan : A. Gambaran histopatologi hepar kelompok perlakuan K1 B. Gambaran histopatologi hepar kelompok perlakuan K2 hewan coba model DM tipe 1 tanpa pemberian ekstrak semut jepang (*Ulomoides dermestoides*); C. Gambaran histopatologi hepar kelompok perlakuan P1 hewan coba model DM tipe 1 dengan pemberian ekstrak semut jepang (*Ulomoides dermestoides*) dosis 2,3 mg/KgBB; D. Gambaran histopatologi hepar kelompok perlakuan P2 hewan coba model DM tipe 1 dengan pemberian ekstrak semut jepang (*Ulomoides dermestoides*) dosis 4,6 mg/KgBB; E. Gambaran histopatologi hepar kelompok perlakuan P3 hewan coba model DM tipe 1 dengan pemberian ekstrak semut jepang (*Ulomoides dermestoides*) dosis 9,2 mg/KgBB.

↑ : Sel Kupfer
 ↑ : Sinusoid
 ↑ : Hepatosit

Gambaran histopatologi hepar kelompok perlakuan K1 (**Gambar 5.1 A**) menunjukkan gambaran mikroskopis hepar yang normal yaitu hepatosit normal dengan inti yang berada di tengah, sinusoid tampak jelas dan beraturan diantara hepatosit dengan persebaran sel Kupffer yang tidak banyak pada sinusoid hepar. Sel Kupffer memiliki warna yang lebih gelap dan ukuran yang lebih kecil dibandingkan dengan hepatosit dengan sitoplasma yang tidak berbatas jelas (Wangko, 2012). Gambaran histopatologi kelompok perlakuan K2 (**Gambar 5.1 B**) merupakan kelompok perlakuan yang diinduksi dengan menggunakan *streptozotocin* dosis 20 mg/KgBB (model DM tipe 1) tanpa diterapi dengan menggunakan ekstrak semut jepang (*Ulomoides dermestoides*) menunjukkan beberapa perubahan pada gambaran mikroskopis hepar yaitu terjadi pelebaran pada sinusoid, sinusoid menjadi tidak beraturan dan terjadi peningkatan pada jumlah sel Kupffer.

Gambaran histopatologi kelompok perlakuan P1 (**Gambar 5.1 C**) merupakan kelompok perlakuan yang diinduksi dengan menggunakan *streptozotocin* dosis 20 mg/KgBB (model DM tipe 1) dengan diterapi menggunakan ekstrak semut jepang (*Ulomoides dermestoides*) dosis 2,3 mg/KgBB selama 14 hari menunjukkan gambaran mikroskopis hepar yaitu sinusoid beraturan di antara hepatosit dengan jumlah sel Kupffer yang tidak terlalu banyak, persebaran sel Kupffer pada kelompok terapi ini memiliki jumlah yang paling sedikit dibandingkan kelompok terapi yang lain. Gambaran histopatologi kelompok perlakuan P2 (**Gambar 5.1 D**) merupakan kelompok perlakuan yang diinduksi dengan menggunakan *streptozotocin* dosis 20 mg/KgBB (model DM tipe 1) dengan

diterapi menggunakan ekstrak semut jepang (*Ulomoides dermestoides*) dosis 4,6 mg/KgBB selama 14 hari menunjukkan gambaran mikroskopis hepar yaitu sinusoid beraturan di antara hepatosit dan sinusoid mengalami pelebaran dengan jumlah sel Kupffer yang masih banyak di sinusoid.

Gambaran histopatologi kelompok perlakuan P3 (**Gambar 5.1 E**) merupakan kelompok perlakuan yang diinduksi dengan menggunakan *streptozotocin* dosis 20 mg/KgBB (model DM tipe 1) dengan diterapi menggunakan ekstrak semut jepang (*Ulomoides dermestoides*) dosis 9,2 mg/KgBB selama 14 hari menunjukkan gambaran mikroskopis hepar yaitu sinusoid yang mengalami pelebaran dan bentuknya tidak beraturan di antara hepatosit dengan jumlah sel Kupffer yang banyak di sinusoid, persebaran sel Kuffer pada kelompok terapi ini memiliki jumlah yang paling banyak dibandingkan kelompok terapi yang lain. Hal ini menunjukkan bahwa, stres oksidatif dan inflamasi yang dipicu oleh pembentukan AGEs akibat kondisi hiperglikemia (Diabetes mellitus tipe 1) masih terjadi pada kelompok perlakuan P3. Data rata-rata jumlah sel Kupffer pada setiap perlakuan disajikan dalam **Tabel 5.2**.

Tabel 5.2 Rata-rata Jumlah Sel Kupffer pada Tikus Masing-masing Kelompok Perlakuan

Kelompok	Rata-rata	SEM	Sig	% Peningkatan Sel Kupffer K2 dibanding K1	% Penurunan Sel Kupffer P1, P2 dan P3 dibanding K2
K1	42,8 ^a	2,29	**	-	-
K2	73,8 ^d	2,07		72,5	-
P1	48,3 ^{ab}	2,32		-	34,5
P2	52,6 ^{bc}	1,15		-	28,7
P3	60,5 ^c	1,26		-	18

Keterangan : notasi a,b,c dan d menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar perlakuan ($p < 0,05$)

- : Tidak signifikan
- * : Signifikan ($p < 0,05$)
- ** : Sangat Signifikan ($p < 0,01$)

Perbandingan rata-rata jumlah sel Kupffer hepar pada **Tabel 5.2** menunjukkan perbedaan nyata antara kelompok perlakuan kontrol negatif K1 ($42,8^a$) dengan kelompok perlakuan kontrol positif K2 ($73,8^d$), terjadi peningkatan jumlah sel Kupffer sebanyak 72,5% pada kelompok K2 dibandingkan dengan K1. Hal ini dikarenakan oleh induksi *streptozotocin* pada kelompok perlakuan K2 menyebabkan terjadinya kerusakan pada sel β pankreas sehingga terjadi hiperglikemia. Tingginya kadar glukosa darah akan meningkatkan proses glikasi dan menghasilkan *Advanced Glycation End Product* (AGEs) yang bersifat glikotoksin dan memicu stres oksidatif dan inflamasi pada hepar. Dalam keadaan stres oksidatif dan inflamasi pada hepar, akan terjadi peningkatan jumlah sel Kupffer yang berfungsi untuk memfagosit agen-agen penyebab terjadinya stres oksidatif dan inflamasi (AGEs). (Regnell *et al.*, 2012)

Perbandingan antara kelompok kontrol positif K2 dengan kelompok terapi P1, P2 dan P3 pada **Tabel 5.2** menunjukkan adanya perbedaan nyata antara kelompok perlakuan K2 ($73,8^d$) dibandingkan dengan kelompok P1($48,3^{ab}$), P2 ($52,6^{bc}$) dan P3 ($60,5^e$), terjadi penurunan jumlah sel Kupffer sebanyak 34,5% pada kelompok perlakuan P1 dibandingkan K2, 28,7% pada kelompok perlakuan P2 dibandingkan K2 dan 18% pada kelompok perlakuan P3 dibandingkan dengan K2. Sedangkan perbandingan rata-rata antara kelompok kontrol negatif K1 ($42,8^a$) dengan kelompok terapi P1($48,3^{ab}$) menunjukkan tidak adanya perbedaan nyata ditunjukkan dengan notasi yang sama, perbandingan rata-rata K1 ($42,8^a$) dengan

kelompok terapi P2 (52,6^{bc}) dan P3 (60,5^c) menunjukkan adanya perbedaan nyata ditunjukkan dengan notasi yang berbeda.

Nilai *Standard Error of Mean* (SEM) merupakan nilai yang menggambarkan sebaran rata-rata sampel terhadap rata-rata dari rata-rata keseluruhan kemungkinan sampel, semakin kecil nilai SEM maka sampel yang digunakan untuk penelitian semakin akurat (Lee *et al.*, 2015). Nilai SEM perhitungan sel Kupffer dari masing-masing kelompok penelitian diantaranya adalah K1 (2,29), K2 (2,07), P1 (2,32), P2 (1,15) dan P3 (1,26), nilai SEM paling rendah adalah 1,15 dan paling tinggi 2,32. Rendahnya nilai SEM pada masing-masing kelompok perlakuan mengindikasikan sampel perhitungan sel Kupffer pada 5 lapang pandang pengamatan cukup mewakili populasi sel Kupffer pada hepar masing-masing perlakuan.

Dosis ekstrak semut jepang (*Ulomoides dermestoides*) 2,3 mg/KgBB merupakan dosis yang paling baik dalam menurunkan jumlah sel Kupffer hepar pada hewan model DM tipe 1 yang diinduksi *streptozotocin* pada penelitian yang dilakukan penulis. Pada kelompok P1 dengan menggunakan dosis 2,3 mg/KgBB selama 14 hari mampu menurunkan jumlah sel Kupffer paling tinggi dibandingkan dengan kelompok P2 dan P3. Semakin tinggi dosis yang diberikan menunjukkan semakin rendah penurunan yang terjadi pada jumlah sel Kupffer dibandingkan dengan kelompok K2.

Diabetes mellitus tipe 1 ditandai dengan hiperglikemia (peningkatan kadar glukosa dalam darah) akibat kerusakan pada sel β pankreas, yang dapat memicu stres oksidatif dan inflamasi pada jaringan karena tingginya produksi AGEs (Ünal *et*

al., 2013; Singh *et al.*, 2014). Hepar merupakan kelenjar pencernaan yang memiliki beberapa fungsi diantaranya adalah digesti, metabolisme, penyimpanan cadangan makanan dan detoksifikasi. Fungsi detoksifikasi dilakukan oleh hepar dengan cara melakukan filtrasi pada darah. Pada darah penderita penyakit DM tipe 1 mengandung AGEs dalam jumlah yang tinggi dan bersifat glikotoksin pada jaringan. Darah yang mengandung AGEs dalam jumlah yang tinggi akan terfiltrasi oleh hepar, AGEs akan berikatan dengan reseptor (*Receptor of Advanced Glycation End Products* (RAGE)) yang berada di sel Kupffer. Tingginya AGEs memicu peningkatan jumlah sel Kupffer hepar pada kelompok hewan model DM tipe 1 (K2, P1, P2 dan P3). Efek terapi pemberian ekstrak semut jepang (*Ulomoides dermestoides*) pada kelompok terapi penelitian (P1, P2 dan P3) yang diinduksi *streptozotocin* secara tidak langsung dipresentasikan oleh jumlah sel Kupffer hepar yang dapat dilihat pada pemeriksaan histopatologi hepar dengan menggunakan pewarnaan HE.

Penurunan jumlah sel Kupffer pada kelompok perlakuan P1, P2 dan P3 yang diberikan ekstrak semut jepang (*Ulomoides dermestoides*) diduga disebabkan oleh aktivitas *limonene* sebagai antioksidan. Pemberian senyawa yang bersifat antioksidan mampu menurunkan stres oksidatif. Pada jumlah rendah *limonene* bekerja sebagai enzim peroksidase dan katalase *like activity* yang dapat mengkatalisis hidrogen peroksida (H_2O_2) yang dihasilkan akibat inaktivasi enzim *cytochrom c oxidase* oleh *nitric oxide*, menjadi lipid alkohol, molekul air (H_2O) dan molekul oksigen (O_2). Lipid alkohol, molekul air (H_2O) dan molekul oksigen (O_2) bersifat aman bagi tubuh. Aktivitas *limonene* dalam jumlah yang rendah mampu

mentralisir ROS (H_2O_2), yang menyebabkan terhambatnya kerusakan sel β pankreas akibat induksi *streptozotocin*, sehingga pembentukan AGEs mengalami penurunan. Turunnya pembentukan AGEs akan menyebabkan turunnya jumlah sel Kupffer pada Hepar (Dhawan, 2014).

Pada jumlah yang tinggi *limonene* bekerja sebagai enzim superoksida dismutase *like activity*, yang berfungsi mengkatalisis superoksida (O_2^-) yang dihasilkan akibat inaktivasi enzim *cytochrom c oxidase* oleh *nitric oxide*, menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) dan molekul air (H_2O). Hidrogen peroksida memiliki sifat merusak DNA pada sel yang dapat mengakibatkan kerusakan pada sel. Peningkatan jumlah pembentukan senyawa hidrogen peroksida akibat penggunaan senyawa *limonene* dalam jumlah tinggi menyebabkan senyawa *limonene* bekerja merusak sel β pankreas (Dhawan, 2014). Sehingga dalam penelitian yang dilakukan oleh penulis, semakin tinggi dosis ekstrak semut jepang yang digunakan maka semakin sedikit jumlah penurunan sel Kupffer yang terjadi dibandingkan dengan kelompok kontrol positif.

Pemberian senyawa *limonene* dalam jumlah yang rendah mampu menghambat kerusakan sel β pankreas sehingga terjadi peningkatan sekresi insulin yang dapat menurunkan kadar glukosa darah pada kelompok perlakuan P1 dibanding kelompok perlakuan K2. Kelompok P1 menunjukkan penurunan kadar glukosa darah dibawah 200 mg/dl, hal ini menunjukkan tikus tidak mengalami DM, akan tetapi beberapa hewan masih mengalami hiperglikemia dengan kadar glukosa darah >135 mg/dl. Sedangkan tikus pada kelompok perlakuan P2 dan P3 masih mengalami DM dengan kadar glukosa >200 mg/dl (**Lampiran 16**). Pengaruh terapi

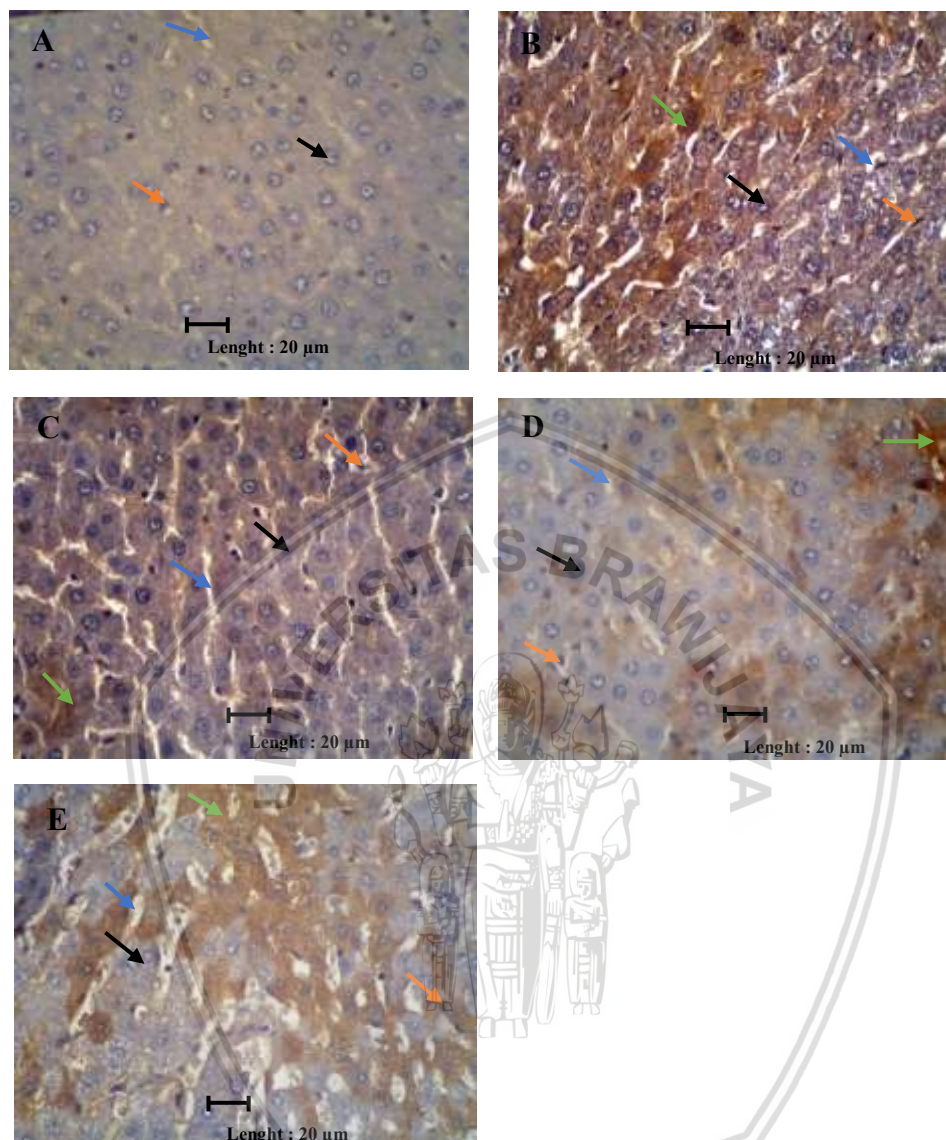
ekstrak semut jepang (*Ulomoides dermestoides*) dalam menurunkan radikal bebas pada organ hepar tikus Wistar (*Rattus novergicus*) yang diinduksi *streptozotocin* ditunjukkan dengan penurunan jumlah sel Kupffer.



5.3 Pengaruh Pemberian Ekstrak Semut Jepang (*Ulomoides dermestoides*) Terhadap Ekspresi TNF- α

Hasil penelitian pengaruh pemberian ekstrak semut jepang (*Ulomoides dermestides*) terhadap ekspresi TNF- α hepar pada tikus Wistar (*Rattus novergicus*) yang diinduksi *streptozotocin* dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya *Olympus* BX51 perbesaran 400X. Perhitungan ekspresi TNF- α dilakukan sebanyak 5 lapang pandang pada masing-masing perlakuan dengan menggunakan aplikasi *Immuno Ratio*. Rataan perhitungan dari masing-masing kelompok perlakuan dianalisa dengan *software* SPSS menggunakan uji *One Way ANOVA* dilanjutkan uji *Tukey* atau *BNJ* ($\alpha=0,05$) (**Tabel 5.3**).

Ekspresi TNF- α dengan menggunakan pewarnaan imunohistokimia ditunjukkan dengan adanya warna kecoklatan. Warna kecoklatan yang timbul akibat dari ikatan antara *anti rat* TNF- α , *anti rat IgG Biotin Labeled* dan kromogen DAB. Ekspresi TNF- α dipengaruhi oleh kondisi patologis tubuh, salah satunya adalah adanya stres oksidatif dan inflamasi pada jaringan. Pada Hepar TNF- α diekspresikan oleh sel Kupffer yang teraktivasi (Jou *et al.*, 2008). Gambaran ekspresi TNF- α dengan menggunakan metode pewarnaan IHK dapat dilihat pada **Gambar 5.2**.



Gambar 5.2 Ekspresi TNF- α Tikus (*Rattus novergicus*) Pewarnaan IHK Perbesaran 400x

Keterangan : A. Ekspresi TNF- α hepar kelompok perlakuan K1; B. Ekspresi TNF- α hepar kelompok perlakuan K2 hewan coba model DM tipe 1 tanpa terapi ekstrak semut jepang (*Ulomoides dermestoides*); C. Ekspresi TNF- α hepar kelompok perlakuan P1 (Terapi 1) hewan coba model DM tipe 1 terapi ekstrak semut jepang (*Ulomoides dermestoides*) dosis 2,3 mg/KgBB; D. Ekspresi TNF- α hepar kelompok perlakuan P2 hewan coba model DM tipe 1 terapi ekstrak semut jepang (*Ulomoides dermestoides*) dosis 4,6 mg/KgBB; E. Ekspresi TNF- α hepar kelompok perlakuan P3 hewan coba model DM tipe 1 terapi ekstrak semut jepang (*Ulomoides dermestoides*) dosis 9,2 mg/KgBB.

- ↑ : Sel Kupfer
- ↑ : Sinusoid
- ↑ : Hepatosit
- ↑ : Ekspresi TNF- α

Tabel 5.3 Rata-rata Presentase Area TNF- α (DAB/Nuclear Area) pada Tikus Masing-masing Kelompok Perlakuan

Kelompok	Rata-rata	SEM	Sig	% Peningkatan Ekspresi TNF- α K2 Dibanding K1	% Penurunan Ekspresi TNF- α P1, P2 dan P3 Dibanding K2
K1	0,29 ^a	0,004	**	-	-
K2	0,62 ^b	0,017		113,8	-
P1	0,32 ^a	0,014		-	48,4
P2	0,55 ^b	0,031		-	11,3
P3	0,55 ^b	0,021		-	11,3

Keterangan : notasi a dan b menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar perlakuan ($p < 0,05$)

- : Tidak signifikan

* : Signifikan ($p < 0,05$)

** : Sangat Signifikan ($p < 0,01$)

Perbandingan rata-rata jumlah ekspresi TNF- α hepar pada **Tabel 5.3** menunjukkan perbedaan nyata antara kelompok perlakuan kontrol negatif K1 (0,29^a) dengan kelompok perlakuan kontrol positif K2 (0,62^b), terjadi peningkatan ekspresi TNF- α sebanyak 113,8% pada kelompok K2 dibandingkan dengan K1. Hal ini dikarenakan oleh induksi *streptozotocin* pada kelompok perlakuan K2 menyebabkan terjadinya kerusakan pada sel β pankreas sehingga terjadi hiperglikemia. Tingginya kadar glukosa darah akan meningkatkan proses glikasi dan menghasilkan *Advanced Glycation End Product* (AGEs) yang bersifat glikotoksin dan memicu stres oksidatif dan inflamasi pada hepar. Dalam keadaan stres oksidatif dan inflamasi akan terjadi peningkatan ekspresi TNF- α , ekspresi TNF- α pada hepar dilakukan oleh hepatosit dan sel Kupffer (Uribarri *et al.*, 2008)

Perbandingan antara kelompok kontrol positif K2 dengan kelompok terapi P1 **Tabel 5.3** menunjukkan adanya perbedaan nyata antara kelompok perlakuan K2 (0,62^b) dibandingkan dengan kelompok P1 (0,32^a), terjadi penurunan ekspresi

TNF- α sebesar 48,4% pada kelompok perlakuan P1 dibandingkan K2. Perbandingan antara kelompok kontrol positif K2 dengan kelompok terapi P2 (0,55^b) dan P3 (0,55^b), menunjukkan tidak adanya perbedaan nyata antara kelompok perlakuan yang ditunjukkan dengan notasi yang sama, terjadi penurunan ekspresi TNF- α sebesar 11,3% pada kelompok perlakuan P2 dan P3 dibandingkan dengan kelompok perlakuan K2.

Kelompok perlakuan P1 (0,3^a) tidak berbeda nyata dengan kelompok K1 (0,3^a) yang ditunjukkan dengan notasi yang sama. Dosis ekstrak semut jepang (*Ulomoides dermestoides*) 2,3 mg/KgBB merupakan dosis yang paling baik dalam menurunkan ekspresi TNF- α pada hewan coba DM tipe 1 yang diinduksi *streptozotocin* yang dilakukan oleh penulis. Pada kelompok P1 dengan menggunakan dosis 2,3 mg/KgBB selama 14 hari mampu menurunkan ekspresi TNF- α paling tinggi dibandingkan dengan kelompok P2 dan P3. Semakin tinggi dosis yang diberikan menunjukkan semakin rendah penurunan yang terjadi pada ekspresi TNF- α dibandingkan dengan kelompok K2.

Nilai SEM perhitungan ekspresi TNF- α dari masing-masing kelompok penelitian diantaranya adalah K1 (0,004), K2 (0,017), P1 (0,014), P2 (0,031) dan P3 (0,021), nilai SEM paling rendah adalah 0,004 dan paling tinggi 0,031. Rendahnya nilai SEM pada masing-masing kelompok perlakuan mengindikasikan keakuratan sampel perhitungan ekspresi TNF- α pada 5 lapang pandang, yang cukup mewakili keseluruhan ekspresi TNF- α pada hepar masing-masing perlakuan.

Diabetes mellitus tipe 1 ditandai dengan kondisi hiperglikemia (peningkatan kadar glukosa dalam darah) akibat kerusakan pada sel β pankreas sehingga terjadi

defisiensi insulin yang bertanggung jawab dalam mengatur kadar glukosa dalam darah (Aji, 2011). Tingginya kadar glukosa dalam darah akan memicu peningkatan proses glikasi yaitu terjadinya ikatan antara glukosa dengan plasma darah, lemak dan asam nukleat melalui reaksi non-enzimatis yang dapat memicu stres oksidatif dan inflamasi pada jaringan. AGEs yang bersifat glikotoksin memiliki reseptor yang berada di makrofag (*Receptor of Advanced Glycation End Products* (RAGE)). Darah yang terfiltrasi oleh hepar, akan memicu terjadinya ikatan antara AGEs dan RAGE pada sel Kupffer yang merupakan makrofag residen pada hepar dan memicu aktivitas dari NFkB (*Nuclear Factor Kappa B*) yang berfungsi untuk mengontrol gen penting salah satunya adalah produksi TNF- α dengan cara mengaktivasi TNF- α *converting enzyme*. Aktivasi TNF- α *converting enzyme* akan menyebabkan terjadinya katalisis prekursor TNF- α menjadi TNF- α , sehingga terjadi ekspresi sitokin pro-inflamasi TNF- α (Yang *et al.*, 2016). AGEs yang terfiltrasi oleh hepar juga akan memicu inflamasi pada hepatosit karena AGEs bersifat memicu stress oksidatif dan inflamasi. Peningkatan ekspresi TNF- α merupakan respon terhadap inflamasi jaringan yang berfungsi untuk mengontrol infeksi dan perbaikan jaringan. Dalam jumlah yang tinggi ekspresi TNF- α dapat memicu kerusakan jaringan (Jou *et al.*, 2008).

Penurunan ekspresi TNF- α pada kelompok perlakuan P1 terapi ekstrak semut jepang (*Ulomoides dermestoides*) diduga disebabkan oleh aktivitas ekstrak semut jepang (*Ulomoides dermestoides*) yang mengandung beberapa senyawa aktif *limonene*, *pentadecanol* dan *methyl palmitate* yang dapat berfungsi sebagai zat antiinflamasi dan antiglikasi. Sebagai zat antiinflamasi *limonene*, *pentadecanol* dan

methyl palmitate bekerja dengan cara menekan sitokin pro-inflamasi, beberapa sitokin pro-inflamasi yang dihambat ekspresinya oleh *limonene*, *pentadecanol* dan *methyl palmitate* diantaranya adalah TNF- α , IL-1 β dan IL-6 (Mendoza-Moza *et al*, 2013). *Limonene*, *pentadecanol* dan *methyl palmitate* sebagai antiinflamasi mampu menghambat aktivitas dari NFkB yang teraktivasi akibat ikatan yang terjadi antara AGEs dan RAGE pada sel Kupffer dan respon inflamasi hepatosit terhadap AGEs. Turunnya aktivitas dari NFkB oleh senyawa aktif *limonene*, *pentadecanol* dan *methyl palmitate* dalam ekstrak semut jepang (*Ulomoides dermestoides*) akan menyebabkan penurunan ekspresi TNF- α (Mendoza-Moza *et al*, 2013).

Limonene dapat bekerja sebagai agen antiglikasi yang dapat menghambat terjadinya proses glikasi sehingga terjadi penurunan pada produksi AGEs. Penurunan produksi AGEs yang bersifat glikotoksin akan berakibat pada penurunan inflamasi pada hepar sehingga terjadi penurunan pada ekspresi TNF- α . Pada penggunaan senyawa *limonene* dalam jumlah tinggi akan mereduksi glukosa menjadi sorbitol yang akan diubah menjadi fruktosa, dimana fruktosa merupakan agen glikosilasi yang akan meningkatkan pembentukan AGEs (Jagdale *et al*, 2016). Hal ini yang menyebabkan pada kelompok perlakuan P2 dan P3 tidak terjadi penurunan ekspresi TNF- α yang signifikan terhadap kelompok perlakuan kontrol positif.

Pengaruh terapi ekstrak semut jepang (*Ulomoides dermestoides*) dalam menurunkan radikal bebas pada organ hepar tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi *streptozotocin* ditunjukkan dengan penurunan ekspresi TNF- α .

BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

1. Pemberian ekstrak semut jepang (*Ulomoides dermestoides*) dapat menurunkan jumlah sel Kupffer dan ekspresi TNF- α pada tikus Wistar (*Rattus novergicus*) yang diinduksi *streptozotocin*, dengan paling baik yaitu 2,3 mg/KgBB. Meskipun demikian penurunan tersebut hanya terjadi pada kelompok P1, sedangkan kelompok P2 dan P3 tidak berbeda dengan kelompok kontrol positif.
2. Pemberian ekstrak semut jepang (*Ulomoides dermestoides*) sebagai terapi DM tipe 1 dalam penelitian yang dilakukan oleh penulis belum mampu menurunkan kadar glukosa darah dalam kelompok terapi sehingga menunjukkan hewan tersebut masih mengalami hiperglikemia dan DM.

6.2 Saran

Saran yang diberikan dari penelitian yang telah dilakukan oleh penulis adalah, penelitian lanjutan dapat dilakukan untuk mengetahui adanya kandungan senyawa *Limonene* dan senyawa kimia lain pada semut jepang (*Ulomoides dermestides*) dan penggunaan senyawa *limonene* dalam rentang dosis yang lebih rendah dapat dilakukan.

DAFTAR PUSTAKA

- Ajeng, Karmila. 2017. *Anatomi, Histologi, Fisiologi Hepar*. https://kupdf.com/download/anatomi-histologi-fisiologihepar5a20d297e2b6f525765ef47d_pdf. [Diakses pada 13 Januari 2018]
- Aji, Haryudi. 2011. Gambaran Klinis dan Laboratoris Diabetes Mellitus Tipe-1 pada Anak. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. Vol. 26 No. 4. <http://jkb.ub.ac.id/index.php/jkb/article/view/383>. [Diakse pada 13 Maret 2018]
- Alexandru, Iliuta. 2011. Experimental Use of Animal in Reasearch Spa. *Balneo-Research Journal*. Vol. 2, Nr. 1. <http://bioclima.ro/J225eng.pdf>. [Diakses pada 25 Februari 2018]
- Aller, M. A., J. L. Arias, J. G. Dominguez, J. I Arias, M. Duran dan J. Arias. 2008. *Experimental Obstructive Cholestasis: The Wound-Like Inflammatory Liver Response*. <https://fibrogenesis.biomedcentral.com/articles/10.1186/1755-1536-1-6>. [Diakses pada 28 Maret 2018]
- Bai, J., Y. Zheng, G. Wang dan P. Liu. 2016. Protective Effect of *Limonene* Against Oxidative Sress- Induced Cell Damaged. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. doi: 10.1155/2016/5962832. [Diakse pada 15 Maret 2018]
- Cantu, D., J. Shaack dan M. Patel. 2005. *Oxidative Inactivation of Mitochondrial Aconitase Results in Iron anh H₂O₂ Mediated Neurotoxicity Primary Mesencephalic Cultures*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2738973/pdf/pone.0007095.pdf>. [Diakses pada 30 Maret 2018]
- Carvalho, E. N D., N. A S. de Carvalho dan L. M. Ferreira. 2003. Experimental Model of Induction of Diabetes mellitus in Rats. *Scielo*. Vol. 18. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502003001100009>. [Diakses pada 14 Maret 2018]
- Catchpole, B., L. J. Kennedy, L. J. Davison, W. E R. Ollier. 2007. Canine Diabetes Mellitus: Can old dogs teach us new tricks?. *Diabetologia*. doi:10.1007/s00125-005-1921-1. [Diakses pada 13 Maret 2018]
- Crespo, R., M. L. Villaverde, J. R. Girotti, A. Güerci, M. P. Juárez. M. G. de Bravo. 2011. Cytotoxic and Genotoxic Effeccts of Defence Secretion of *Ulomoides dermestoides* on A549 Cells. *Science Direct*. Volume 136, Issue 1, Pages 204-209. doi: 10.1016/j.jep.2011.04.056. [Diakses pada 27 Maret 2018]



- Dhawan, Veena. 2014. Reactive Oxygen and Nitrogen Species : General Consideration. *Springer Science*. DOI 10.1007/97-1-4939-6_2 [Diakses pada 25 Juni 2018]
- Dixon, L. J., M. Barnes. H. Tang, M. T. Pritchard dan L. E. Nagy. 2013. Kupffer Cell in The Liver. *Compr Physiol*. 3(2): 785-797. doi: 10.1002/cphy.c120026. [Diakses pada 23 Maret 2018]
- Doi, Yuki dan N. Takaya. 2015. A Novel A3 Groups Aconitase Tolerates Oxidation and Nitric Oxide. *Journal Bio Chemistry*. 16;290(3): 1412-1421. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4340388/>. [Diakses pada 28 Maret 2017]
- Emami, S.A., B. Javadi dan M. K. Hassanzedah. 2007. Antioxidant Activity of The Essential Oil of Different Part of *Juniperus Communis*. Subsp hemisphaerica and *Juniperus oblonga*. *Journal of Pharmaceutical Biology*. Vol. 45, No. 10, pp 769-776. <https://doi.org/10.1080/13880200701585931>. [Diakses pada 17 Maret 2018]
- Goud, B. J., V. Dwarakanath, B. K. C. Swamy. 2015. Streptozotocin – A Diabetogenic Agent in Anim. [al Models. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Research*. Vol:3, Issue:1. <http://ijppr.humanjournals.com/wp-content/uploads/2015/04/18.Busineni-Jayasimha-Goud-Dwarakanath.V-B.K.Chikka-swamy.pdf>. [Diakses pada 19 Maret 2018]
- Goyal, N., R. Kaur, A. Sud, N. Ghorpade dan M. Gupta. 2014. Non-Diabetic and Stress Induced Hyperglycemia (SIH) in Orthopedic Practice What do we know so Far?. *Journal of Clinical Diagnosis Res*. 8(10): LH01-LH03. doi: 10.7860/JCDR/2014/10027.5022. [Diakses pada 01 Juni 2018]
- Jagdale, Ashwini D., L. N. Bavkar, T. A. More, M. M. Joglekar dan A. U. Arvindekar. 2016. Strong Inhibition of The Polyol Pathway Divert Glucose Flux to Protein Glycation Leading to Rapid Establishment of Secondary Complication in Diabetes Mellitus. *Journal of Diabetes Mellitus and Its Complication*. 30(2016) 398-405. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2016.01.001>. [Diakses pada 4 Juni 2018]
- Jou, J., S. S. Choi dan A. M. Diehl. 2008. Mechanisms of Disease Progression in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Seminars in Liver Disease*. Volume 28, Number 4. doi: 10.1055/s-0028-1091981.[Diakses pada 23 Maret 2018]
- Kemetrician Kesehatan Republik Indonesia. 2014. *Situasi dan Analisis Diabetes*. [<http://www.depkes.go.id/resources/download/pusdatin/infodatin/infodatin-diabetes.pdf>] <Diakses pada 23 Desember 2017>

- Kim, Young W., M. J. Kim, B. Y. Choung, D. Y. Bang. 2013. Safety Evaluation and Risk Assessment of *Limonene*. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 16:17-38. doi: 10.1080/10937404.2013.769418. [Diakses pada 29 April 2018]
- Lee, Dong K., J. In dan S. Lee. 2015. Standard Deviation and Standard Error of The Mean. *Korean Journal Anesthesiol.* 68(3): 220-223. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4452664/>. [Diakses pada 13 Mei 2018]
- Lorenzi, Mara. 2007. Review Article: The Polyol Pathway as a Mechanism for Diabetic Retinopathy: Attractive, Elusive and Resilient. *Experimental Diabetic Research*. 61038, 10 pages. Doi: 10.1155/2007/61038. [Diakses pada 5 Juni 2018]
- Maggiore, Ann Della. 2014. *Diabetes Mellitus in Dogs and Cats: Diagnosis, Treatment, Prognosis*. <http://vetspecialists.com/diabetes-mellitus-in-dogs-and-cats-diagnosis-treatment-prognosis/>. [Diakses pada 23 Desember 2017]
- Martin, M., D. O'Neill, D. Church, P. D. McGreevy, P. C. Thompson dan D. Brodbelt. 2014. An Epidemiological Study of Diabetes Mellitus in Dogs Attending First Opinion Practice in The UK. *The Veterinary Record*. 174: 349. doi:10.1136/vr.101950. [Diakses pada 17 Maret 2018]
- Mendoza-Meza, D. L., P. España-Puccini. 2016. Cytotoxic and Genotoxic of Phenolic Fraction From *Ulomoides dermestoides* Fairmaire, 1893 (Coleoptera, Tenebrionidae), in HaCat Cell. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 19(2):83-91. <http://www.redalyc.org/html/432/43246005001/>. [Diakses pada 7 April 2018]
- Mendoza-Meza, D. L., S. Saavedra A. 2013. Chemical Composition and Anti-Irritant Capacity of Whole Body Extracts of *Ulomoides dermestoides* (Coleoptera, Tenebrionidae). *Revista de La Facultad de Química Farmacéutica*. Vol. 20 No. 1. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-40042013000100005. [Diakses pada 28 April 2018]
- Morillo-Garcia, Y., J. Olivero-Verbel, K. Caballero-Gallardo. 2016. Life Cycle of *Ulomoides dermestoides* (Fairmaire, 1893) (Coleoptera: Tenebrionidae) Under Laboratory Conditions. *Elsevier*. 69(2016): 272-275. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2016.09.007>. [Diakses pada 3 April 2018]
- Nugroho, E. Agung. 2006. Review: Hewan Percobaan Diabetes Mellitus: Patologi dan Mekanisme Aksi Diabetogenik. *BIODIVERSITAS ISSN: 1412-033X*. Volume 7, Nomor 4 Oktober 2006. Halaman: 378-382.

<http://biodiversitas.mipa.uns.ac.id/D/D0704/D070415.pdf>. [Diakses pada 27 Maret 2018]

O'Neill, D. G., R. Goetelov, C. Orme, D. B. Church, S. J. M. Niessen, K. Verheyen dan D. C. Brodbelt. 2016. Epidemiological of Diabetes Mellitus Among 193.435 Cats Attending Primary Care Veterinary Practices in England. *Journal Vet Intern Med.* 30(4): 964-972. doi: 10.1111/jvim.14365. [Diakses pada 4 April 2018]

Qaid, Mohammed M. dan M. M. Abdelrahman. 2016. Role of Insulin and Other Related Hormones in Energy Metabolism-a Review. *Cogent Food and Agriculture.* 2: 1267691. <https://www.cogentoa.com/article/10.1080/23311932.2016.1267691>. [Diakses pada 5 April 2018]

Qian, J., Defu Child an Rusong Chai. 2016. Possible Function of The Microtrichia on The Cuticle of *Ulomoides dermestoides* (Chevrolet) (Coleoptera:Tenebrionidae). *Journal of Foresty Research.* 27(6):1391-1405. DOI10.1007/s11676-016-0261-y. [Diakses pada 13 April 2018]

Regnell, Simon E. dan A. Lernmark. 2012. Hepatic Steatosis in Type 1 Diabetes. *Diabetes Study.* 8(4): 454-467. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3359690/>. [Diakses pada 17 Februari 2018]

Rosol, Thomas J., R. A DeLellis, P. W. Harvey dan C. Sutcliffe. 2013. Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124157590000583>. [Diakses pada 29 Maret 2017]

Sari, Ratih Pratiwi, N. Ariani dan D. R. Febrianti. 2017. Efek Ekstrak Etanol Semut Jepang Terhadap Penurunan Kadar Asam Urat Darah Tikus Putih Jantan. *Jurnal Ilmiah Ibnu Sina.* 2(2), 197-203. <http://jiis.akfar-isfibjm.ac.id/index.php/JIIS/article/download/115/94>. [Diakses pada 7 Maret 2018]

Sarti, P., A. Giuffre, E. Forte, D. Mastronicola, M. C. Barone dan M. Brunori. 2000. Nitric Oxide and Cytochrome C Oxidase: Mechanism of Inhibition and NO Degradation. *Biochem Biophys Res Commun.* 21;274(1):183-7. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10903916>. [Diakses pada 3 Maret 2018]

Schull, S., S.D. Gunther, J. M. Seeger, B. Tosetti, K. Wiegmann, C. Pongratz, F. Diaz, A. Witt, M. Andree, K. Brinkmann, M. Kronke, R. J. Wiesnar dan H. Kashkar. 2015. Cythochrome C Oxidase Deficiency Accelerates Mitochondrial Apoptosis by Activating Ceramide Synthase 6. *Cell Death and Disease.* 6(3): e1691. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4385940/>. [Diakses pada 4 Maret 2018]

- Shao, J., B. Zhou, A. J. Di Billio. L. Zhu, T. Wang, C. Qi, J. Shih dan Yun Yen. 2005. A Feerous-Triapine Complex Mediated Formation of Reactive Oxygen Species that Inactivate Human Ribonucleotide Reductase. *Molecular Cancer Therapeutics*. 5(3):588-92. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16546972>. [Diakses pada 11 April 2018]
- Short, M. A. 2004. Linking the Sepsis Triad Iflammatin, Coaglation and Suppressed Fibrinolysis to Infants. *Adv Neonatal Care*. 5: 258-72. <https://www.medscape.com/viewarticle/493246>. [Diakses pada 11 April 2018]
- Silva-Abreu, M., L. C. Espinoza, M. J. R. Lagunas, M. C. Fabrega, M. Espina, M. L. Garcia dan A. C. Calpena. 2017. Human Skin Permeation Studies with PPAR- γ Agonist to Improve Its Permeability and Efficacy n Inflammatory Processes. *Journal of Molecular Sciences*. Doi:10.3390/ijms18122548. [Diakses pada 4 Juni 2018]
- Singh, V. P., A. Bali, N. Singh dan A. S. Jaggi. 2014. Advanced Glycation End Products and Diabetic Complications. *Korean Journal Physiol Pharmacol*. 18(1): 1-14. doi: 10.4196/kjpp.2014.18.1.1. [Diakses pda 4 April 2018]
- Srinivasan, S., N. G. Avadhani. 2012. Cytochrome Oxidase Dysfunction in Oxidative Stress. *Free Radic Biol Mel*. 53(6): 1252-1263. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3436951/>. [Diakses pada 04 Maret 2018]
- Supit, I. A., D. H. C. Pangemanan dan S. R. Marunduh. 2015. Profil Tumor Nerosis Fator (TNF- α) Berdasarkan Indeks Massa Tubuh (IMT) pada Mahasiswa Kedokteran Unsrat Angkatan 2014. *Jurnal e-Biomedik*. Volume 3, Nomor 2. <https://ejournal.unsrat.ac.id/index.php/ebiomedik/article/view/8621>. [Diakses pada 21 Maret 2018]
- Supranto, J. 2000. *Teknik Sampling untuk Survei dan Eksperimen*. Jakarta: PT. Rineka Cipta
- Sviglerova, J., J. Kuncova dan M. Stengl. 2015. Cardiovascular Models: Heart Secondarily Affected by Disease. *Animal Study for Human Disease*. Pages 195-220. <https://www.intechopen.com/books/basic-principles-and-clinical-significance-of-oxidative-stress/biochemistry-of-reactive-oxygen-and-nitrogen-species>. [Diakses pada 15 Maret 2017]
- Turner, Patricia V., T. Brabb, C. Pekow dan M. A. Vasbinder. 2011. Administration of Substances to Laboratory Animals: Routes of Administration and Factors to Consider. *Jornal of America Association for Laboratory Animal Science*.

Vol. 50, No. 5, Pages 600-613. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3189662/>. [Diakses pada 5 April 2018]

Uribarri, J., S. Woodruff, S. Goodman, W. Cai, X. Chen, R. Pyzik, A. Yong, G E Striker dan H. Vlassara. 2010. Advanced Glycation End Products in Food ang Practical Guide to Their Reduction in the Diet. *Journal Am Diet Association*. 110(6):911-16.e12. doi: 10.1016/j. [Diakses pada 9 April 2018]

Ünal, D., A. Kara, A. Aksak, B. Z. Altunkaynak, S. Yildirim. 2012. Insulin Hormone: Mechanism and Effects on The Body and Relationship with Central Nervous system. *Dicle Medical Journal*. 39(2):310-315. <http://diclemedj.org/upload/sayi/2/DicleMedJ-01067.pdf>. [Diakses pada 1 April 2018]

Upadhyay, Ravi Kant. 2016. Review Article: Antidiabetic Potential of Plant Natural Products. *International Journal of Green Pharmacy*. 10(3):S96. Doi: 10.S96/ijgp11980. [Diakses pada 4 Juni 2016]

Vdoviakova, K., E. Petrovova, L. Kresakova, M. Maloveska, J. Teleky, J. Jencova, J. Zivcak, A. Jenca. 2016. Importance Rat Liver Morphology and Vasculature in Surgical Reasearch. *Med Sci Monit*. 22: 4716-4728. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5153322/pdf/medscimonit-22-4716.pdf>. [Diakses pada 26 Maret 2018]

Vaissi, S., P. Parto dan M. Sharifi. 2017. Anatomical and Histologic al Study of Liver and Pancreas of two Closely Realted Mountain Newts *Neurergus microspilotus* and *N. kaiser* (Amphibia: Caudata: Salamandridae). *Scielo*. 34:e13229 ISSN 1984-4689. <https://doi.org/10.3897/zoologia.34.e13229>. [Diakses pada 9 April 2018]

Vasanthi, P., G. Nalini dan G. Rajsekhar. 2007. Role Of Tumor Necrosis Factor-Alpha in Rheumatoid Arthritis: A review. *APLAR Journal of Rheumatology*. 10: 270-274. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1479-8077.2007.00305>. [Diakses pada 29 Maret 2018]

Wangko, Sunny. 2012. Peran Sel Kupffer pada Steatohepatitis Alkohol. *Jurnal Biomedik*. Volume 4, Nomor 2, Halaman: 79-87. <https://ejournal.unsrat.ac.id/index.php/biomedik/article/view/755>. [Diakses pada 3 April 2018]

World Health Organization. 1999. *Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complication*. http://www.who.int/diabetes/publications/Definition%20and%20diagnosis%20of%20diabetes_new.pdf. [Diakses pada 23 Februari 2018]

- Yang, Yoon Mee dan E. Seki. 2016. TNF α in Liver Fibrosis. *Curr Pathobiol Rep.* 3(4): 253-261. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4693602/>. [Diakses pada 04 Maret 2018]
- Yusuf, Ahmad Aulia. 2009. *Histoteknik Dasar*. staff.ui.ac.id/system/files/users/ahmad.aulia/material/histoteknikdasar.2009.doc. [Diakses pada 18 Maret 2018]

